2008.03.13

# UPLC/MS/MS システム取扱説明書
# 分析操作手順
# （定性 編）

# 目次（定性編）

# Ⅰ　分析操作手順

本装置（高性能タンデム四重極 LC/MS/MS システム）は，Ultra Performance LC™ （ACUITY UPLC）と Waters Micromass Quattro Premier，Mass Lynx4.0 ワークステーションで構成された UPLC/MS/MS システムです。

本装置では，

1　UPLC のみの利用（図 1）

2　LC/MS としての利用（図 2）

3　LC/MS/MS としての利用（図 3）

が可能です。

※UPLC 単独の利用の際にも，
MS を立ち上げる必要がありますので，
以下の操作に注意してご利用ください。

また，LC/MS，LC/MS/MS として利用する際も，まずは UPLC のみで分析条件・試料濃度・注入量を検討してから，MS 分析を行ってください。

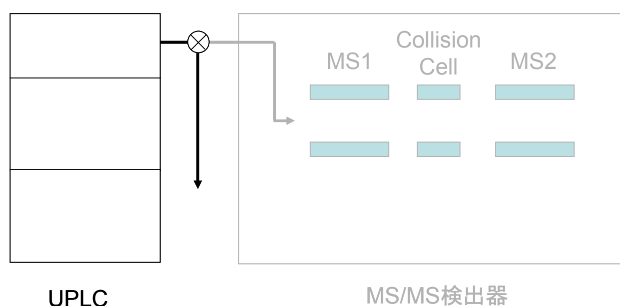


図 1　UPLC 単独時の概念図

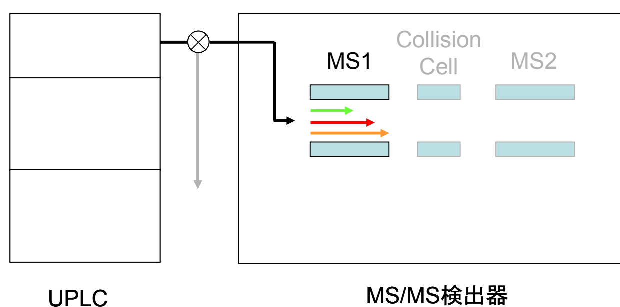


図 2　LC/MS 利用時の概念図

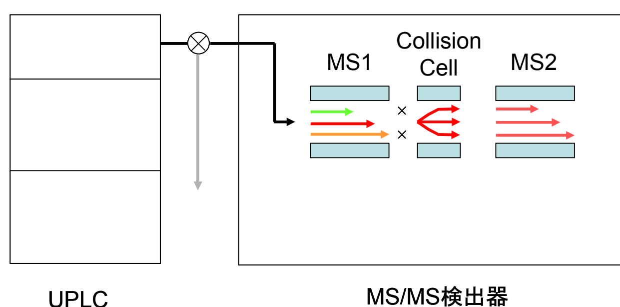


図 3　LC/MS/MS 利用時の概念図

## １ 基本的な手順

UPLC 分析（試料の分析条件・試料濃度・注入量の確認）
↓
↓　ピーク面積による定量
↓
LC/MS 分析（イオン化条件の検討）：　ESI＋, ESI－, APCI＋, APCI－
↓
LC/MS 分析（イオン化電圧の検討）：　Cone 電圧　（Capillary 電圧）
↓
↓　定量（SIR 測定）
↓
LC/MS/MS 分析（イオン化電圧の検討）：Collision energy の検討
↓
定量（MRM 測定）

# Ⅱ UPLC のみの利用手順

**以下の手順で行います。**

1 システムの起動
2 Inlet Method の作成
3 MS Method の呼び出し
4 送液開始
5 サンプルリストの作成
6 分析開始

UPLC/MS/MS に必要な器具・薬品，システムの起動方法は，「UPLC/MS/MS システム取扱説明書　起動と終了編」を参照してください。

※操作を行う前に，次の確認を行ってください。

MS 本体の LOAD ボタンが緑色に点灯しているか，コーン内が移動相で濡れていないか確認してください。

A 1 と A2 ラインは超純水（ボトル A)，B1 と B2 ラインはメタノール(ボトル B)に投入されているか確認してください。分析終了後，使用したラインをこの溶媒に切り替えてください。なお，これらの溶媒の量が少ない場合は，補充してください。

インジェクターのニードル洗浄用溶媒（SNW および WNW）とポンプのプランジャーシール部分の洗浄用溶媒（SW）にはアセトニトリル：超純水＝90:10（洗浄液①），および 100%アセトニトリル(洗浄液②)の 2 種類の溶媒を使用しています。これらの溶媒が十分にあるかどうか，確認してください。もし，100 mL をきっている場合は管理室へご連絡ください。

## １ システムの起動

①電源の投入

　コンピューターの電源，$N_2$ 発生器の電源，UPLC（バイナリーポンプとインジェクター）の電源を投入してください。

②移動相の交換

　準備した水系の移動相を A1 または A2 ラインに投入し，有機溶媒系の移動相を B1 または B2 ラインに投入してください。

③Inlet Method の立ち上げ

　UPLC の操作はすべて Inlet method で行います。
MassLynx の Status ボタン①を押し(図 4)，画面左端にある Inlet Method②をクリックし，Inlet Method 画面を立ち上げる。

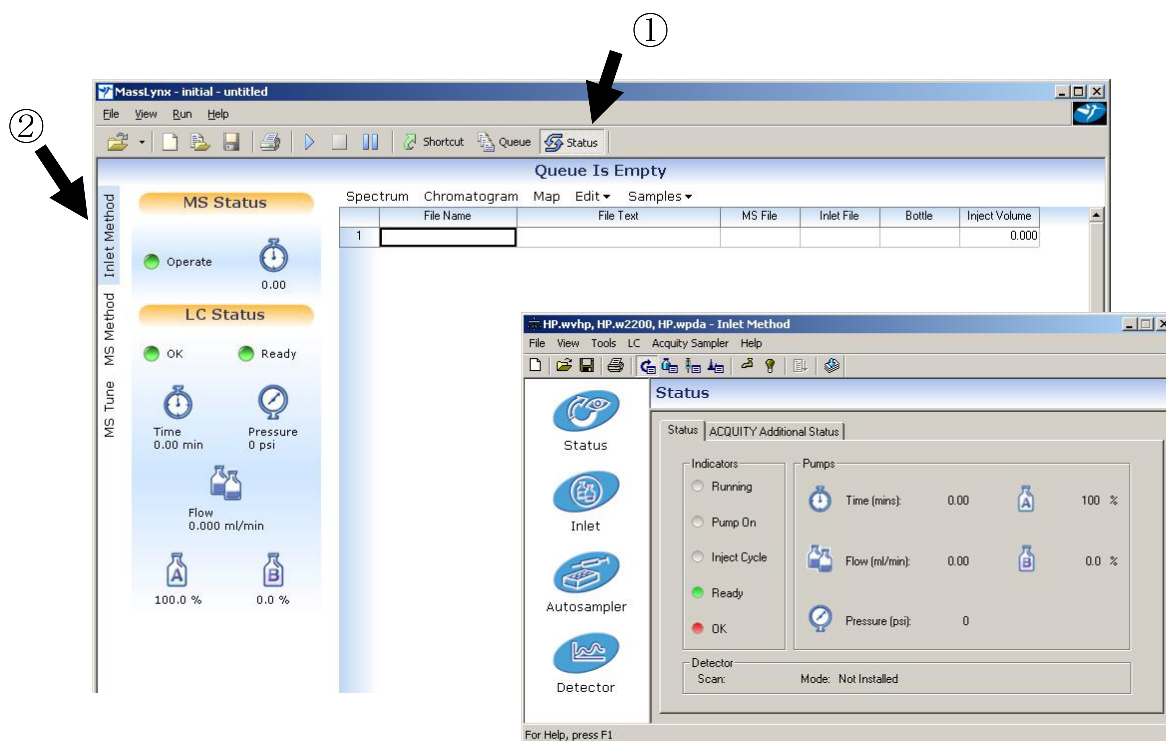
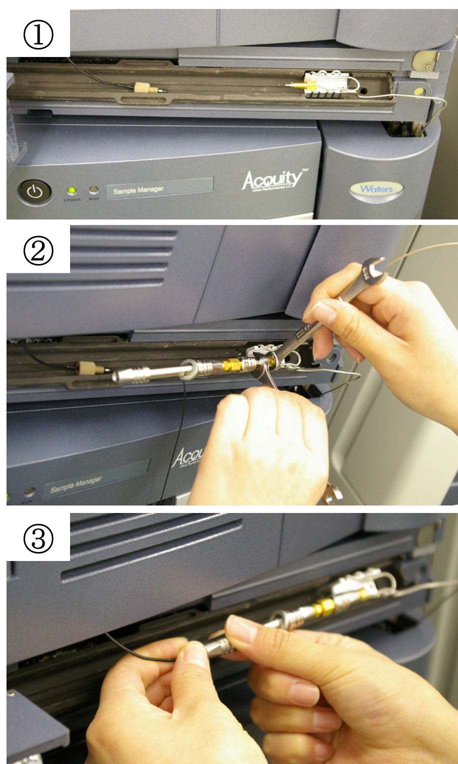


図 4　Inlet method 画面の立ち上げ

④カラムの接続

カラムオーブンはインジェクターと PDA 検出器の間にあります。カラムの接続は次のように行ってください（図 5)。



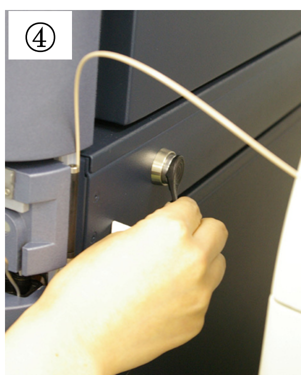




図 5　カラムの接続方法

（1）オーブンのドアを開け，カラムホルダーを前に倒してラインを出します。
通常はカラムがはずされた状態になっています。

（2）ご使用になるカラムまたはフローインジェクション用のパイプを取り付けてください。画面右側のラインがポンプ側です。カラム先端をポンプ側のラインに工具で接続します。このとき，あまり強く締めすぎないように注意してください。

（3）カラムの出口側を検出器側のラインに接続します。こちらは手締めで十分です。

（4）Waters 純正のカラムには円形の金属が付属しています。この中には IC タグがあり，これをカラムオーブンの右側面にある通信装置に接続します。これにより，カラムの使用履歴が PC に記録されます。カラムを取り外すときまでは，接続を保持してください。

※新品のカラムを初めて使用する際の注意

新品のカラムを初めて使用する場合，内部の担体が移動相によりわずかに排出される場合があります。排出された担体が UPLC の配管に入ると，詰まりの原因となるので，新品カラムを最初に使用するときは，カラム入口にポンプ側のラインを接続した後，検出器側のラインを接続する前にカラム出口から直接 1mL 程度移動相を排出させてください。

⑤ポンプのプライム（移動相置換）

前回と同じ移動相を使用する場合はプライムの必要はありませんが，使用する移動相を変更した場合は必ず実行してください。プライムは移動相のボトルからポンプまでを新しい移動相で満たすための操作です。この段階ではポンプからカラムへは移動相は供給されません。

※この操作を行う前に，MS 装置の LOAD が点灯し，INJECT が消灯していることを再度確認してください。



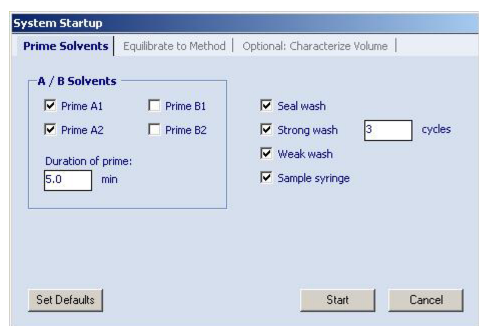




図 6　ポンプのプライム方法

（1）Inlet method-ACQUITY Additional Status タブをクリックする（図 6)。

（2）ACQUITY Binary Solvent Manager と書いてある部分にマウスカーソルを置き，右クリックしてポップアップウィンドウを表示させる。

（3）上から２番目の Start up system を選択する。

（4）System Startup 画面が表示されるので，Prime Solvents タブを選択し，A/B Solvents の Prime を開始するラインにチェックを入れる。

（5）Duration of prime は５分を設定する。

（6）Seal wash，Strong wash，Weak wash，Sample syringe にすべてチェックをいれ，3cycles を指定する。Start ボタンを押すと，プライムが開始されます。(約 5 分)

プライム終了後，移動相が自動的に送液されます（Flow に緑色のランプが点灯します)。

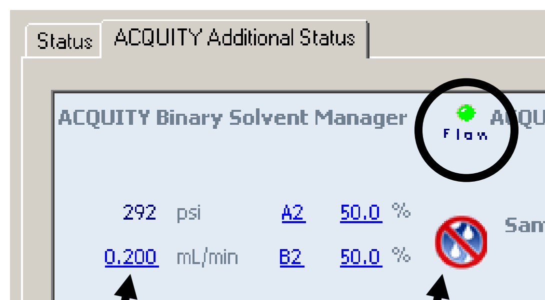



図 7　送液

⑥UPLC の送液開始

Inlet method の ACQUITY Additional Status タブをクリックする（図 8)。

ACQUITY Binary Solvent Manager 内の A，B のどちらかをクリックする。

Set Flow 画面が現れるので，流速，A, B ラインの比率を設定します（分析の初期条件の比率)。

チェックをクリックすると送液が開始されます。

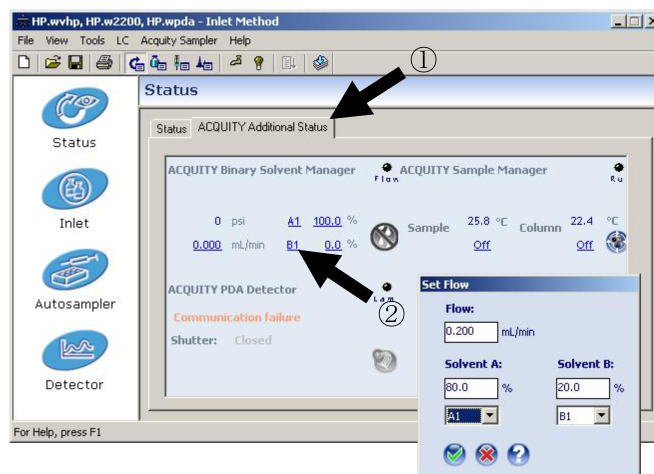



図 8　ポンプの作動条件の決定

同一画面の右側，ACQUITY　Sample Manager のカラム温度をクリックし（図 9)，カラム温度とサンプルインジェクターの温度を設定する。

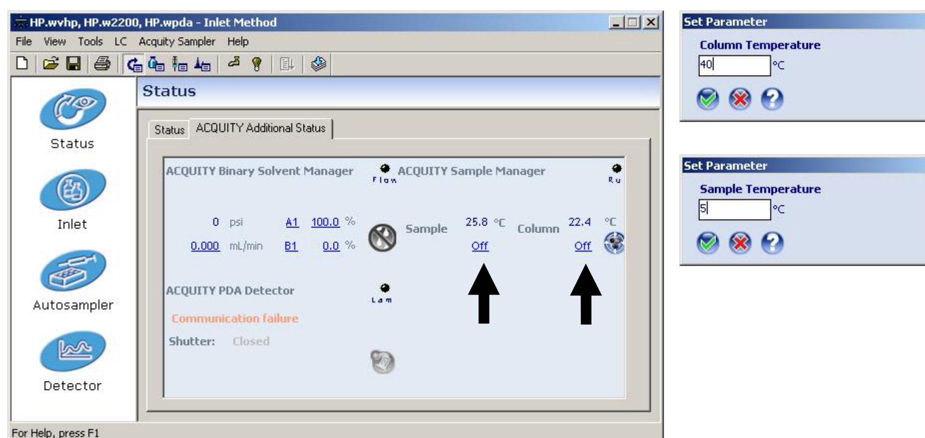



図 9　カラム温度とインジェクターの温度設定

⑦PDA 検出器の起動

PDA 検出器の電源を入れ，PDA 検出器のランプが緑色に点滅し，緑色に点灯するまで数分待つ。

緑色に点灯したら，Inlet method の[LC]-[Reset Communication]をクリックする（図 10)。

Status タブをクリックし，Indicator の Pump on，Ready，OK の項目が緑色になっていることを確認する。

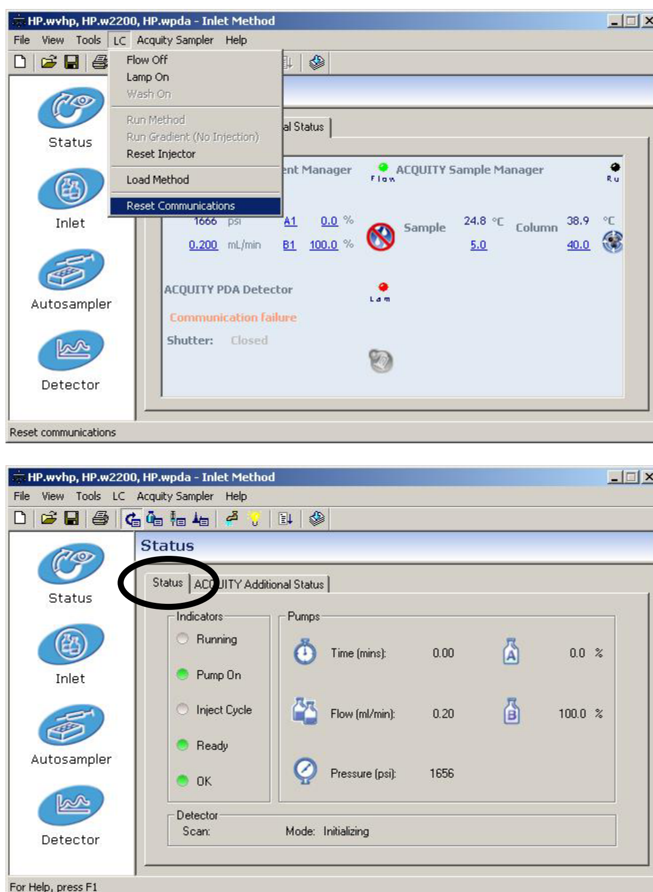



図 10　PDA の起動

## ２ Inlet Method の作成

Inlet Method では，Inlet，Auto sampler，Detector の設定を行います。それぞれの設定は，図 11 中の①②③アイコンをクリックして行います。

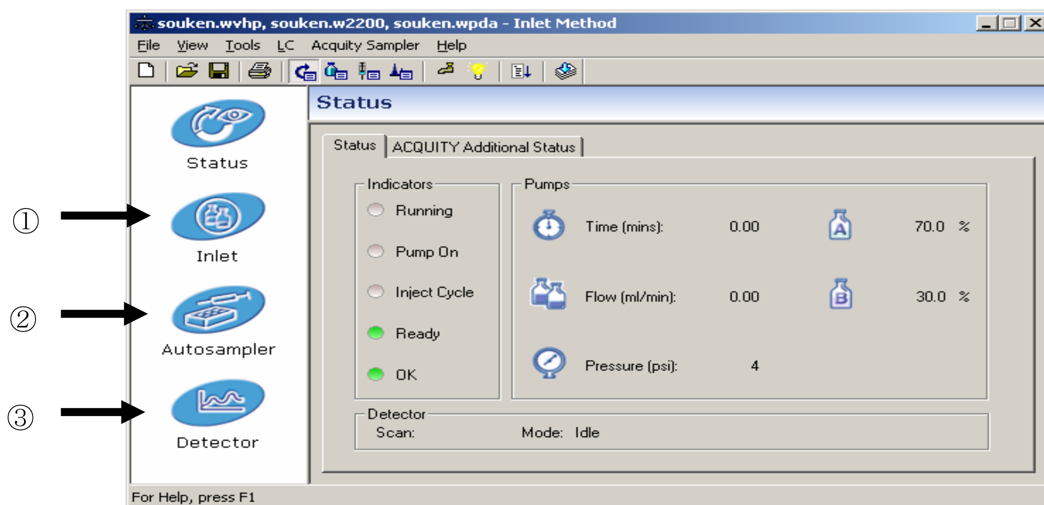



図 11　Inlet Method の作成

①Inlet の作成（ポンプ条件）

（図 12）

（１） General の項にある「Solvents」に溶媒を選択・入力します。

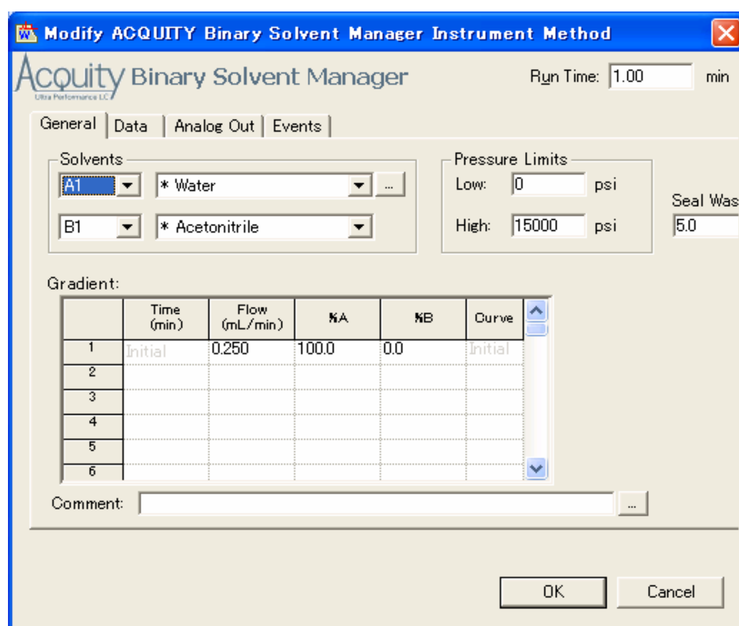



図 12 Inlet の入力

（２）「Gradient」の入力。

Flow(流速)はカラムの耐圧の範囲内で設定してください。

なお，MS への接続を考慮する場合，流速は 0.2～0.4 ml/min にしてください。

（３）アイソクラティックで分析する場合は，1 行目のみの入力となります。

（４）グラジエントを行う場合

Time(min)，%A，%B に必要事項を入力してください。

（Curve は自動で入りますので，入力する必要はありません。）

※参考）HPLC の条件を UPLC にあてはめる際に，ACQUITY UPLC Columns Calculator（図 13）を使うと便利です。

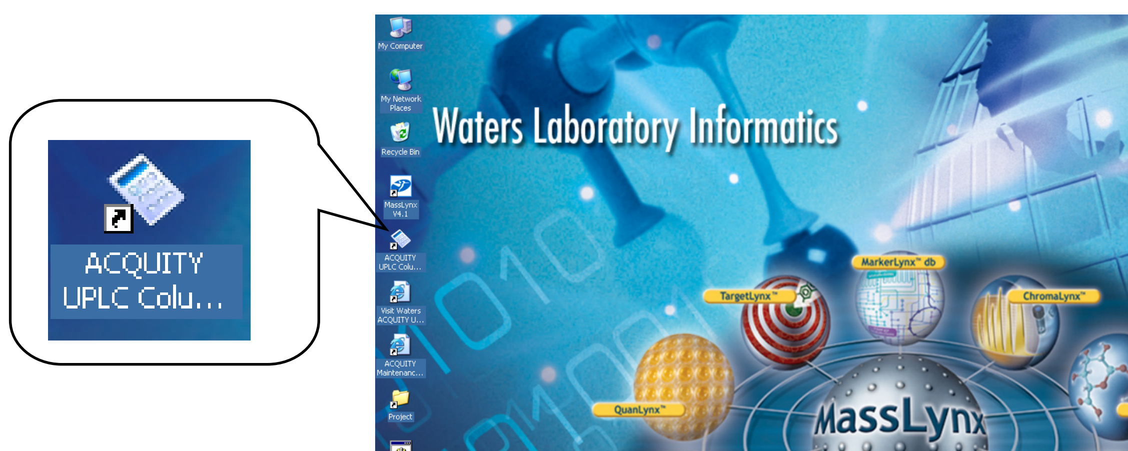
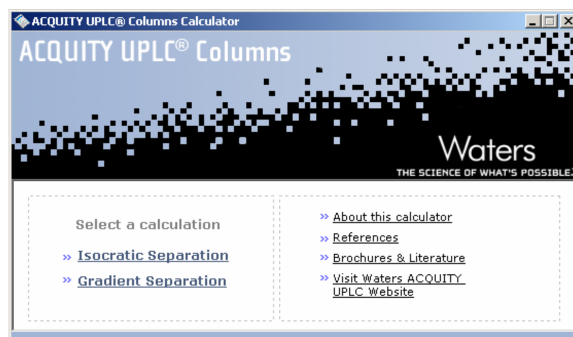



図 13　ACUITY UPLC Columns Calculator の起動

ACQUITY UPLC Columns Calculator をダブルクリックし，[Gradient Separation]を選択する。




HPLC で使用した
カラムの長さ(Column Length)，
内径（Column Diameter)，
孔径（Particle Size）を選択する。

サンプルの分子量(MW of Sample)は適当でかまいません。

分析条件を選択・入力する。
Flow rate（流速)，
Temperature（温度)，
Injection Volume（注入量）を入力してください。
Delay は適当でかまいません。

グラジエント条件を入力する。

Time (min)と%B を入力する。

[Calculate]ボタンを押す。

図 14　Calculator 画面①

図 15 の Change Flow に流速(0.2～0.4)を入力し，[Calculate]ボタンをクリックする。

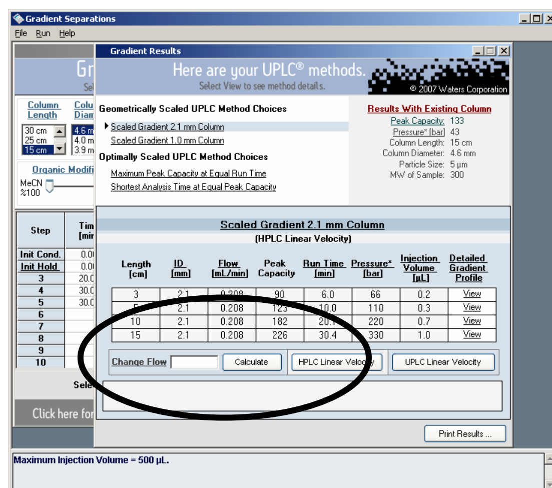



図 15　Calculator 画面②

使用している UPLC のカラムサイズのところの[view]をクリックする。

グラジエント条件が出てきます（図 16）。

あくまでもファーストチョイスとして利用してください。

Calculator はそのまま閉じてください。

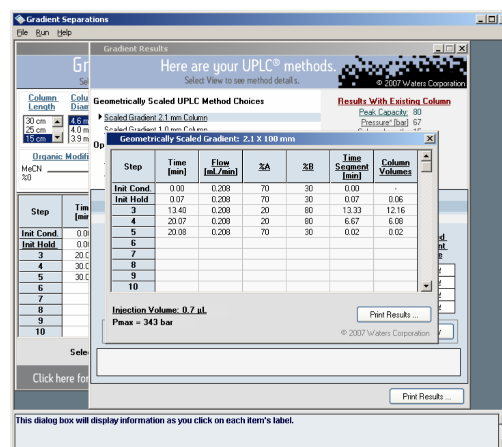



図 16　UPLC でのグラジエント条件

（5）Inlet 画面で

グラジエント条件を入力する（図 17）。

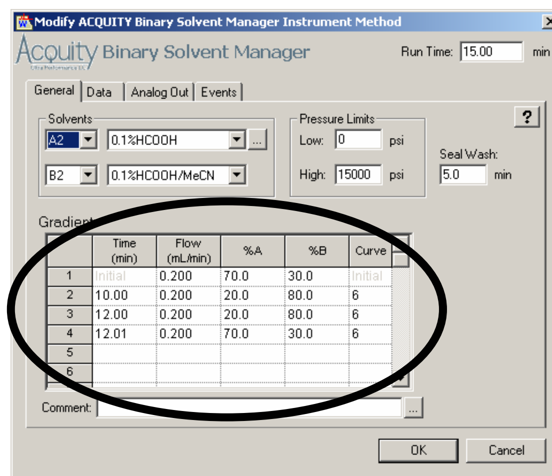



図 17　Inlet へのグラジエント条件の入力

（６）Run time に分析する時間を入力する（図 18)。この時間以上のデータは取り込みませんので，注意してください。

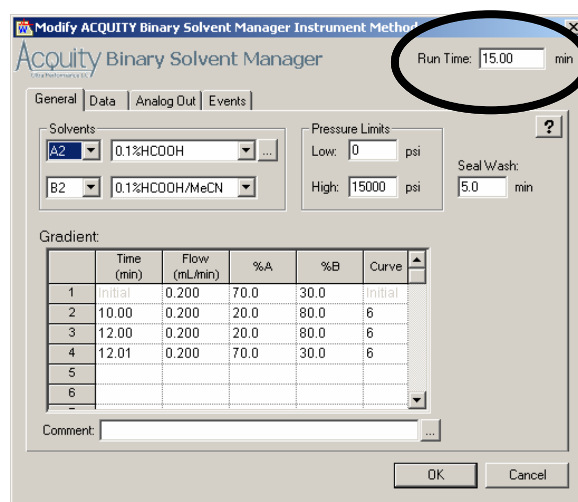



図 18　Run Time の入力

連続分析をする場合

　方法はいくつかありますが，グラジエントの場合は，最終列に初期濃度を入力しておき，長めの Run Time を設定しておくと，移動相が初期濃度に戻り，安定した連続分析が可能となります。

　Data，Analog Out，Events のところは，使いません。

（７）入力終了後 OK を押す。（ｐ８　図 11 に戻ります）

②Auto sampler の作成（注入条件の設定）

基本的には，General の項で，「Run Time」と「カラム温度」と「Sample 温度」を入力します（図 19)。

（１） Run Time には上記 Inlet と同じ分析する時間を入力する。

（２）Column（カラム温度）には，適切な温度を入力する。
Sample にはオートサンプラー内のサンプルを加温・冷却する温度（４～４０℃）を入力する。

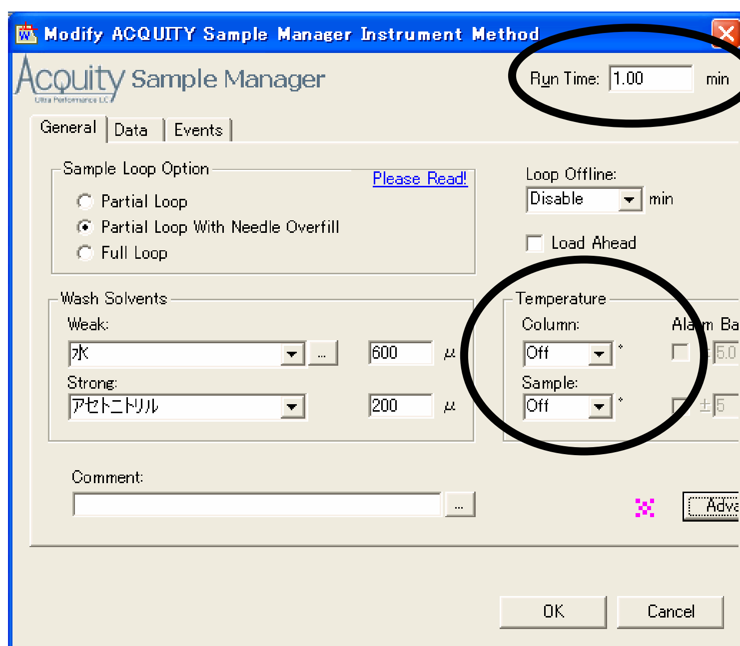



図 19　Auto sampler の入力

（３）Sample loop option は[Partial Loop With Needle Overfill]を選択してください。

（４）[Advanced]の前に，ピンク色のアスタリスクがついていることを確認してください。ついていない場合は，[Advanced]をクリックし，Needle overfill frash を３ □l とし，チェックマーク入れて下さい。

Data，Event のところは使用しません。

（５）入力終了後 OK を押す。(p8 図 11 に戻ります)

③Detector の作成（検出器の設定）

（図 20）

General の項で，「Run Time」と「Range」の範囲を入力します。

（1） Run Time には上記と同じ分析時間を入力する。

（2） Enable 3D Data にチェックを入れると PDA，無ければ UV（1 点の波長）となります。

なお，検出する範囲は 190～500 nm となります。

色素の場合は，MS では検出できますが，クロマト上では小さく見えるか，検出されないので注意してください。

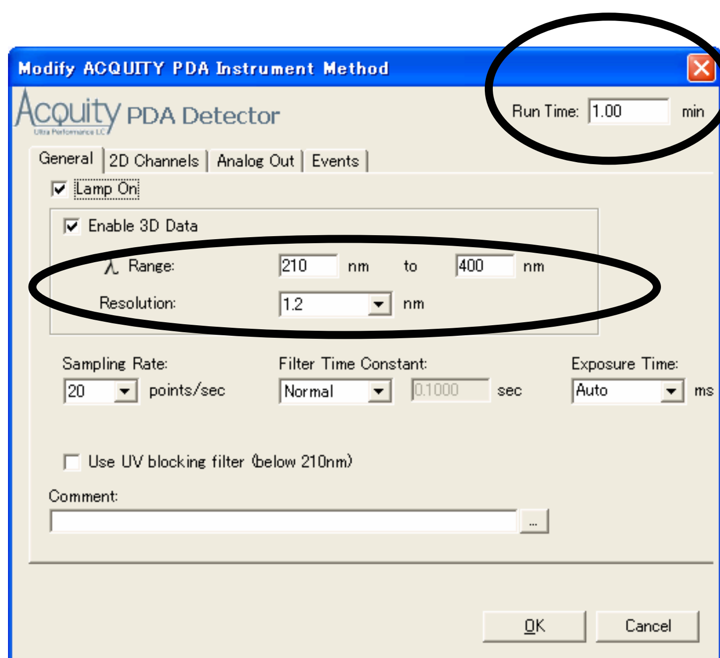



図 20　Detector の入力

（3） 2 D Cannels の項で，特定の波長を入力すると，分析中のリアルタイムモニターで，特定の波長のクロマトグラムを見ることができます（図 21）。

（入力しなくても，PDA での測定では，後から特定の波長のクロマトグラムを抽出することができます。）

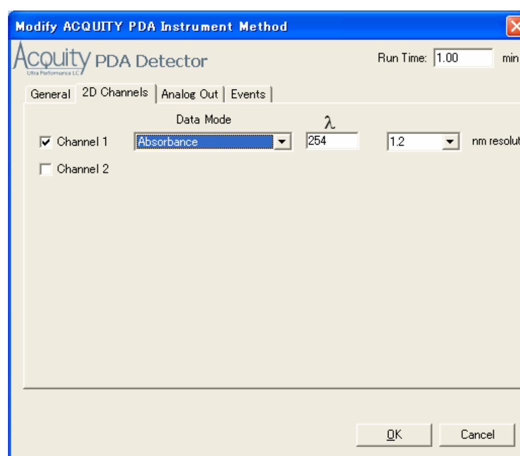



図 21　2 D Channels の入力

Analog Out, Events のところは使いません。

（4）入力終了後 OK を押す。（p8 図 11 に戻ります）

Inlet, Auto sampler, Detector に必要事項を入力後，作成した Inlet Method を[File]-[Save as]よりデータを保存してください（図 22）。

※このファイルは閉じずに下に隠しておいてください。

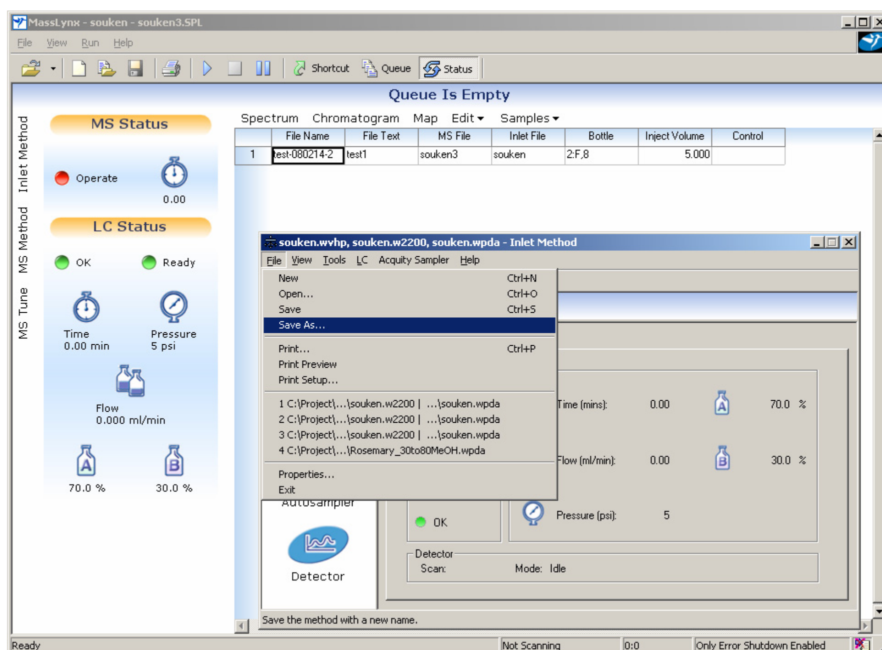


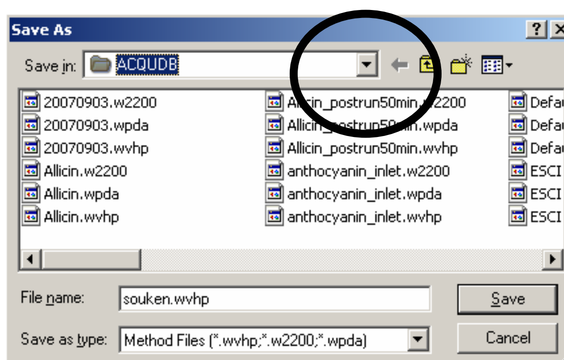
図 22　Inlet Method の保存

データ名を付けて保存する際，

保存する先を確認してください。

自分のプロジェクト下に無い場合は，

自分の Project の中の ACQUDB フォルダへ保存するようにしてください（図 23）。



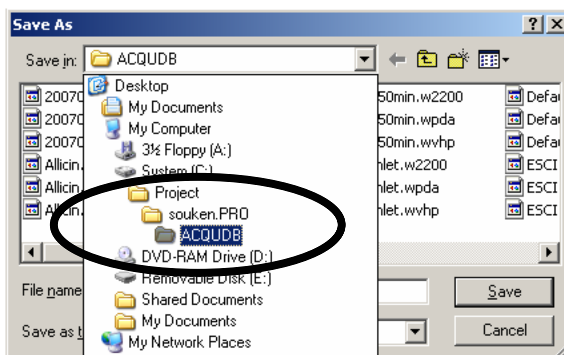


図 23　保存先の確認

3　MS Method の呼び出し

①MassLynx の Status ボタン①を押し（図 24），左端にある MS Method②をクリックする。

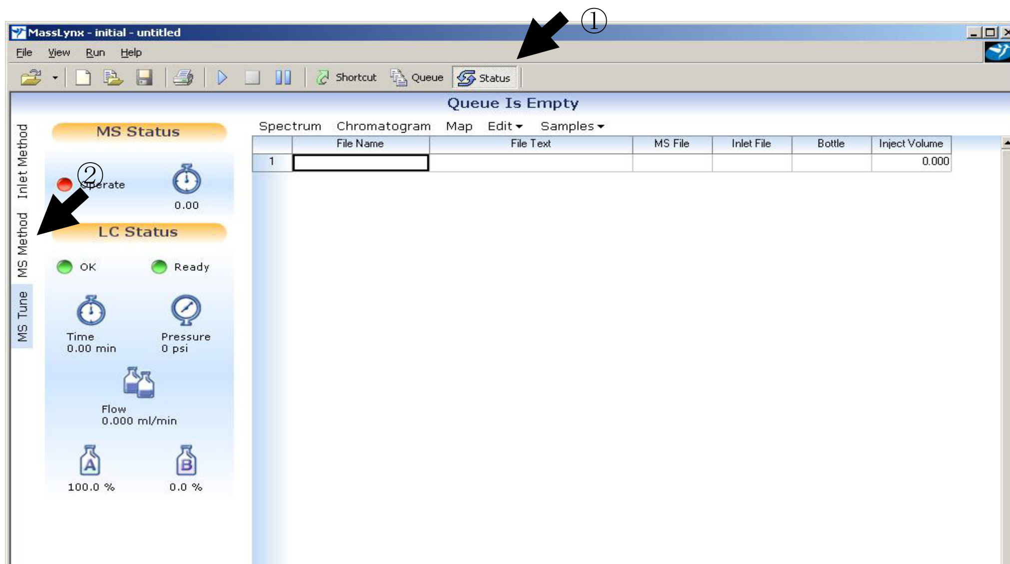



図 24　MS Method 画面の起動

② [File]から UPLConly のファイルを呼び出す（図 25)。

なお，ここで使用する MS Method ファイル(UPLConly)は，自分のプロジェクトをデフォルトから作成する際に，自動的に作成されます。

③Total Run Time に UPLC と同じ分析時間を入力する。(0.00 分でも問題ありませんが，リアルタイムでクロマトグラムが見られません。データは取れます。)

④[File]→[Save] 保存（時間を変えるだけなので，上書きで問題ありません)。

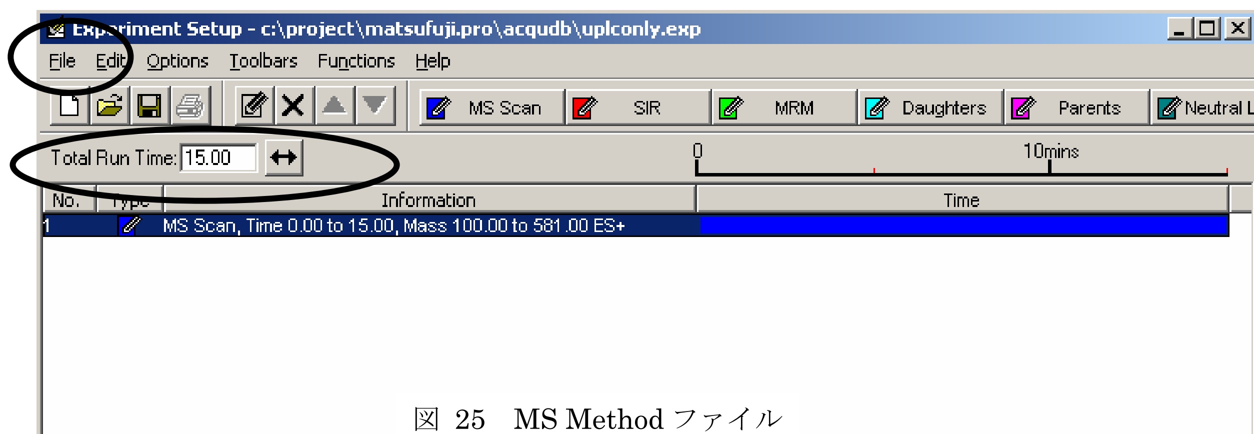



図 25　MS Method ファイル

※このファイルは閉じずに下に隠しておいてください。

## 4 送液開始

送液を開始します。

Inlet ファイルで Pump On に緑色のランプがついていると，移動相は送液されています（図 26）。

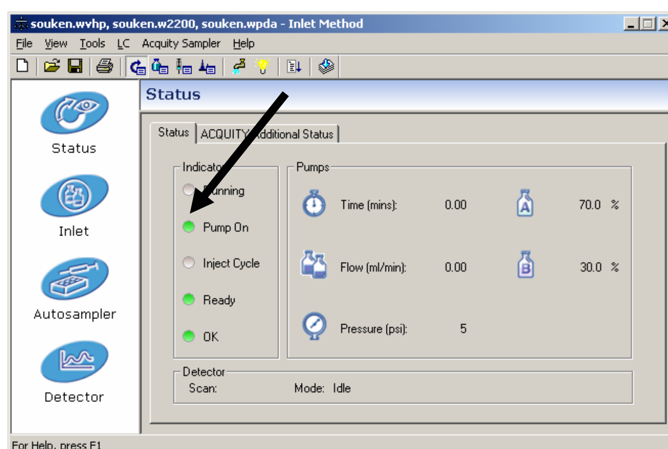



図 26 Inlet method 画面①

もし付いていない場合は，図 27 に矢印で示した蛇口のアイコン，または 0.000 mL/min となっているところをクリックし，送液を開始する。

その際，ポンプ（A1・A2，B1・B2）のラインおよび組成比が正しいかどうか確認してください。

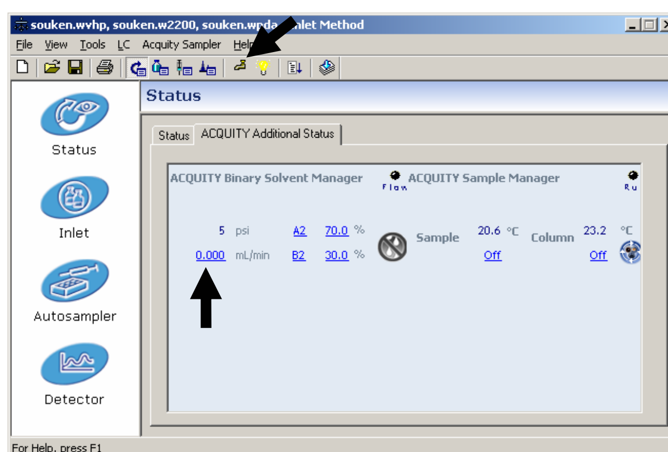
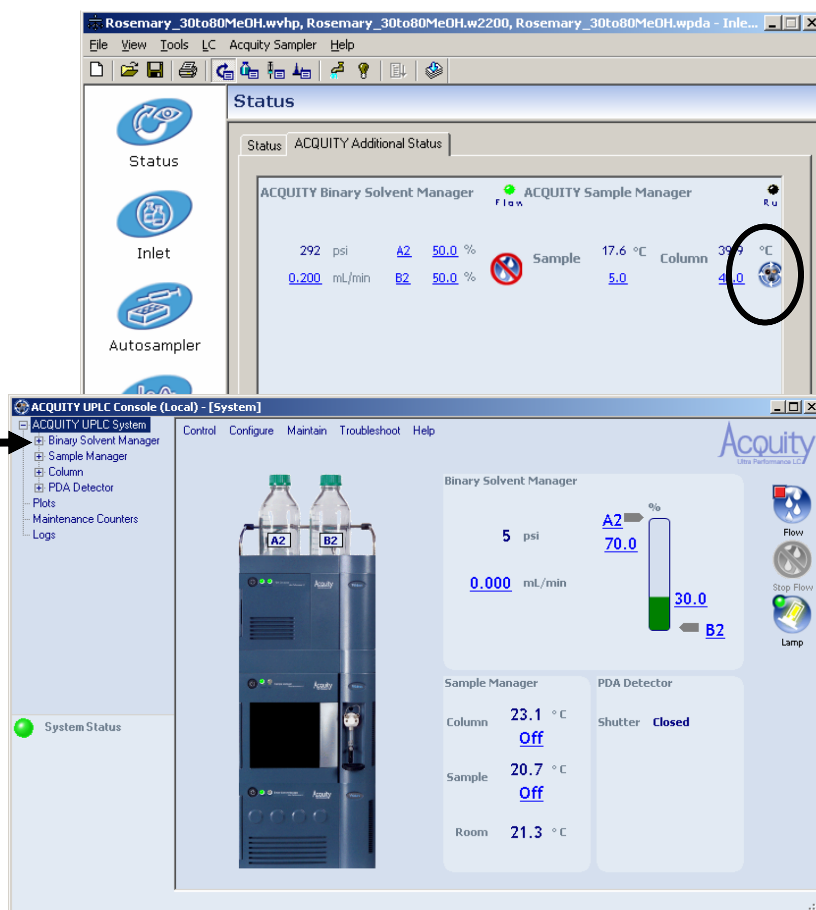



図 27 Inlet method 画面②

ACQUITY Additional Status にある Console をクリックすると，圧力がチェックできます。圧力の Delta の値が 40 以下になると，ポンプが安定している：分析開始の目安となります。

Inlet ファイルの Console アイコンをクリックする。

開いた Console 画面の [Binary Solvent Manager]をクリックする。




矢印で示した Delta 値が 40 以下であれば，ポンプが安定していますので，試料注入が可能です。

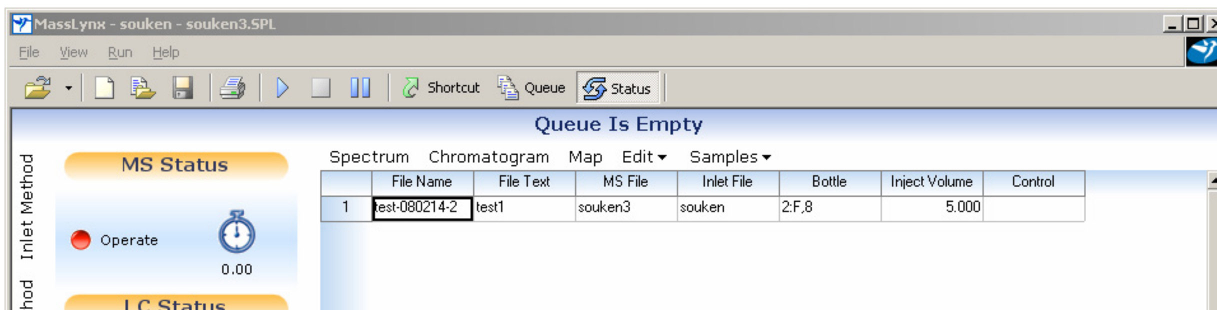
時間が経てば安定しますので，次のサンプルリストを作成し，分析開始時にはチェックするようにしてください。




図 28 Console 画面

5 サンプルリストの作成

File Name，File Text，MS File，Inlet File，Bottle，Injection Volume に必要な情報を入力する（図 29）。




| | File Name | File Text | MS File | Inlet File | Bottle | Inject Volume | Control |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | test-080214-2 | test1 | souken3 | souken | 2:F,8 | 5.000 | |

図 29　Sample List の作成

※サンプルリストが変更されている場合は，以下の操作をしてください。

[Samples]→[Format]→[Load...]から default.fmt を呼び出す（図 30）。

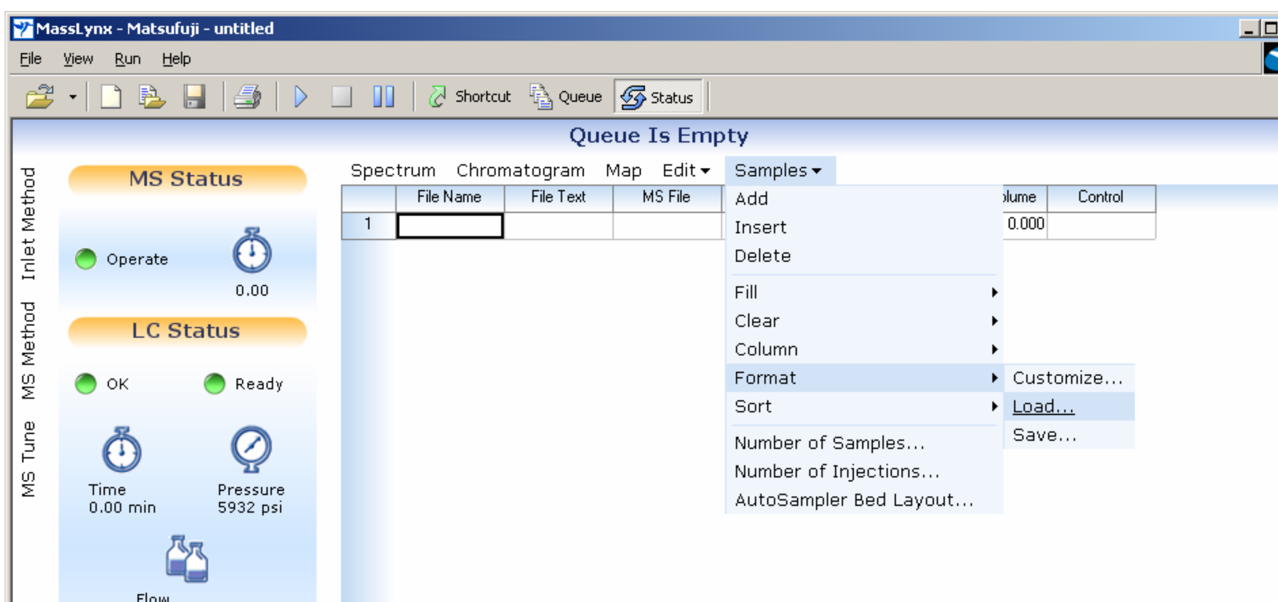



図 30　Sample List （デフォルト）の呼び出し

①サンプルリストへ必要事項を入力する（図 31)。

（１）File Name：データを保存する名前。(同じ名前は上書きされるので，日付や通し番号などを名前の後に入力した方がよいでしょう。)
（２）File Text：覚え書き（印刷時に目安となります。)
（３）MS File：ダブルクリックし，UPLConly ファイルを呼び出します。
（４）Inlet File：ダブルクリックし，作成したファイルを呼び出します。
（５）Bottle：ボトル位置を選択します。(バイアルは専用のものを使用してください。)
（６）Injection Volume には試料の注入量を入力してください。

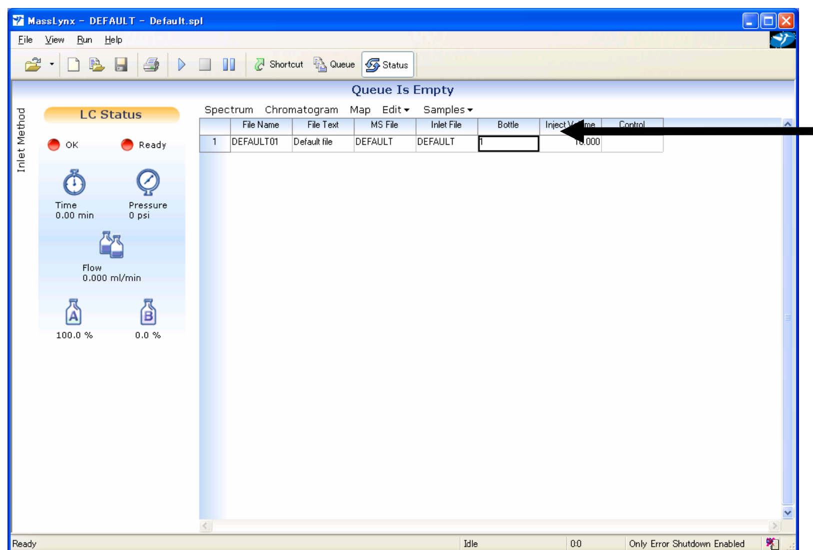



図 31　サンプルリストの入力

②Bottle 欄への入力

Bottle のところで，右クリックし，[Auto Sampler Bed Layout]を選択すると，図 32 が現れます。

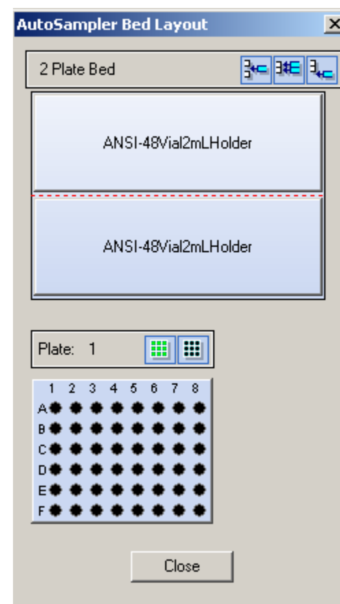



図 32　AutoSampler Bed Layout 画面①

試料をおいたプレート（1 or 2）とその位置をクリックします。

プレート１においた場合は図のプレート１を，
プレート２においた場合はプレート２をクリックする。

プレート２の A の１に試料をおいた場合は A-1 をクリックする（緑色に反転します）。

このファイルの上で，右クリックし，[Replace]を押すと，Bottle に試料位置が記載される。

例）2：A,1　や，1：F,2　など

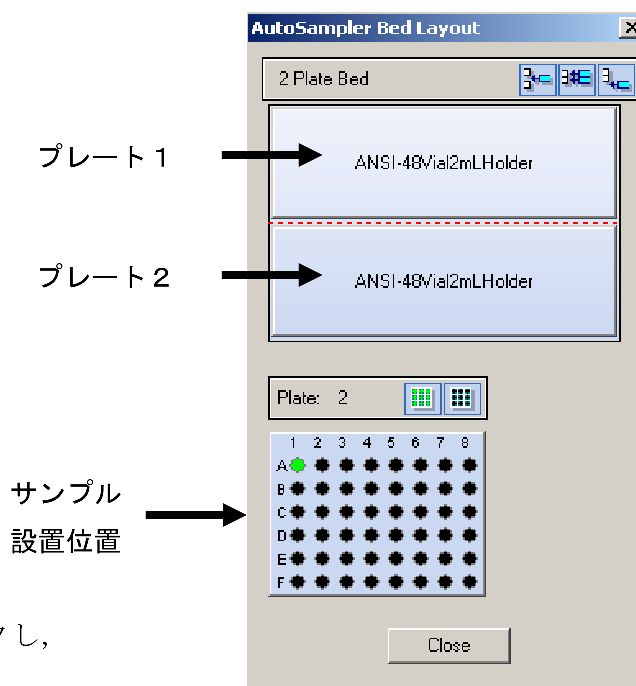



図 33　Auto Sampler Bed Layout 画面

複数本の試料を連続分析するときは，[Samples]→[Add]を選択し（図 34），追加したいサンプル数を入力し，OK を押す。

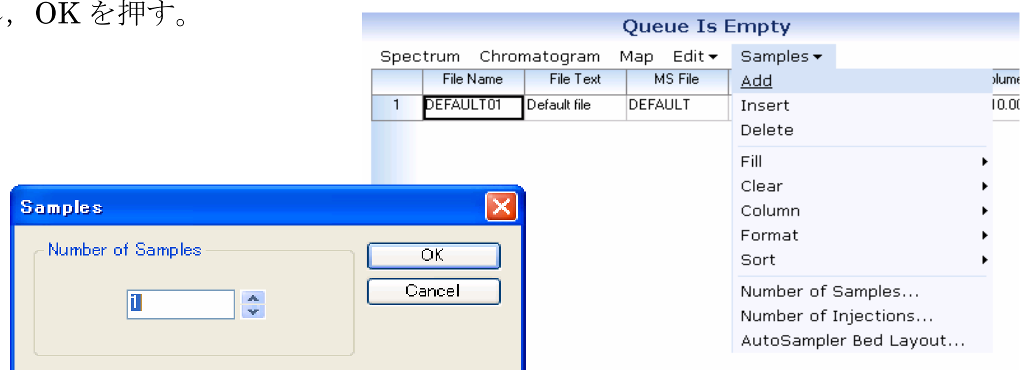



図 34　Samples メニュ

サンプルリストに必要事項を入力する。

Spectrum　Chromatogram　Map　Edit　Samples

| | File Name | File Text | MS File | Inlet File | Bottle | Inject Volume | Co |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | DEFAULT01 | Default file01 | DEFAULT | DEFAULT | 1:A, 1 | 10.000 | |
| 2 | DEFAULT02 | Default file01 | DEFAULT | DEFAULT | 1:A, 2 | 10.000 | |
| 3 | DEFAULT03 | Default file01 | DEFAULT | DEFAULT | 1:A, 3 | 10.000 | |
| 4 | DEFAULT04 | Default file01 | DEFAULT | DEFAULT | 1:A, 4 | 10.000 | |
| 5 | DEFAULT05 | Default file01 | DEFAULT | DEFAULT | 1:A, 5 | 10.000 | |
| 6 | DEFAULT06 | Default file01 | DEFAULT | DEFAULT | 1:A, 6 | 10.000 | |

図 35　サンプルリスト画面

③サンプルリストに必要事項を入力したら，[File]→[Save As]より保存（図 36)。

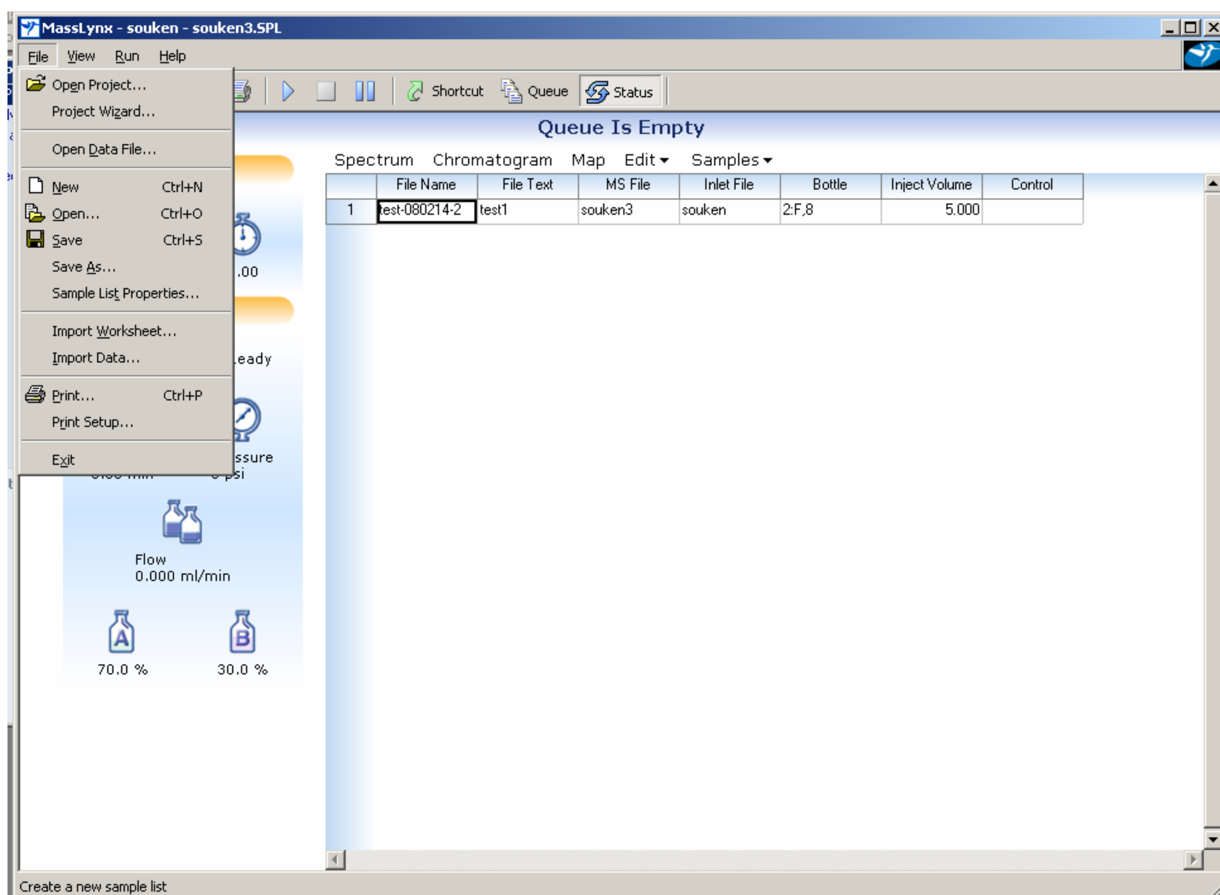


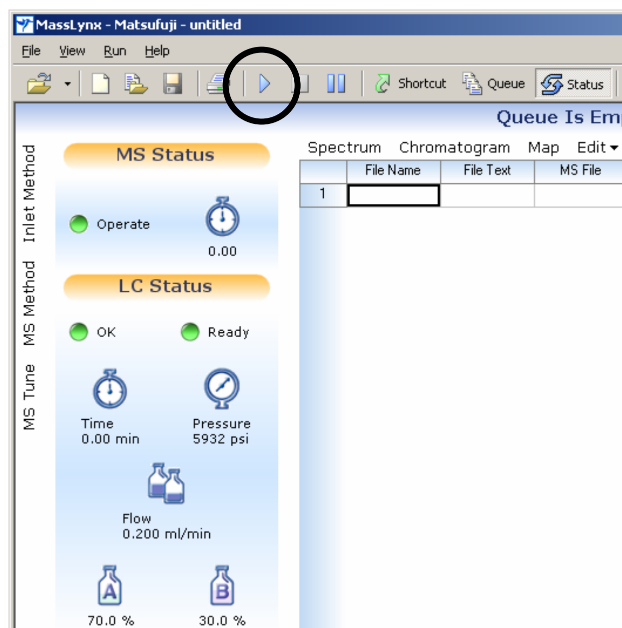

図 36 サンプルリストの保存

※ プロジェクト内で同じサンプルリスト名があると，上書きされます。

※ また，サンプルリスト名が異なっていても，File Name が同じ場合，データが上書きされます。

## ６ 分析開始

（１）上部にある ▶ マーク（図 57）をクリックすると，分析が開始される。




複数の試料の場合は，分析したいサンプルを選択（行が黒く反転）し，▶ マークをクリックする（図 57）。

図 38　分析の開始①

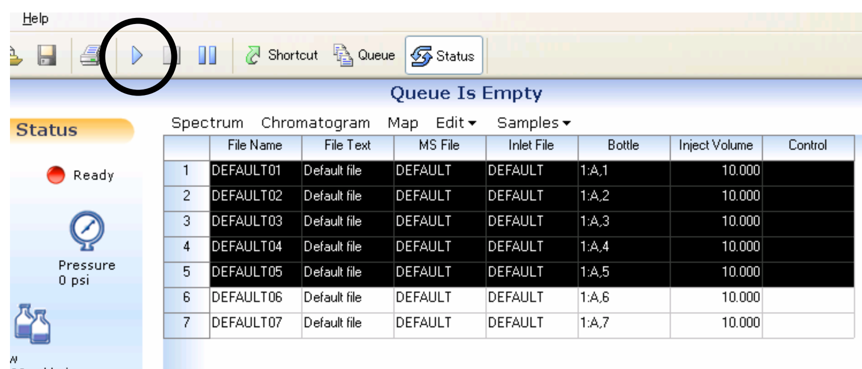



図 38　分析の開始②

（２）Start Sample List Run 画面の[Acquire Sample Data]にチェックマークを入れ，OK を押す。

File Name やサンプルリストに同じ名前があるときは，上書きするかどうかのメッセージが出てきます。

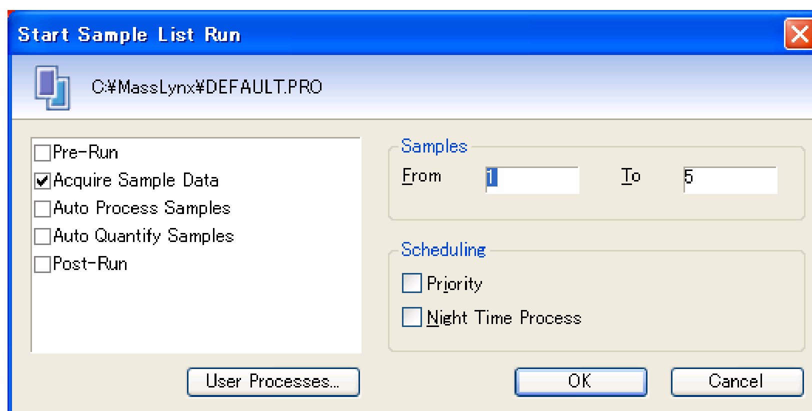



図 39　Start Sample List Run 画面

①分析中の動作

分析中に[Queue]をクリックすると（図 40），分析が開始されているか確認することができます。

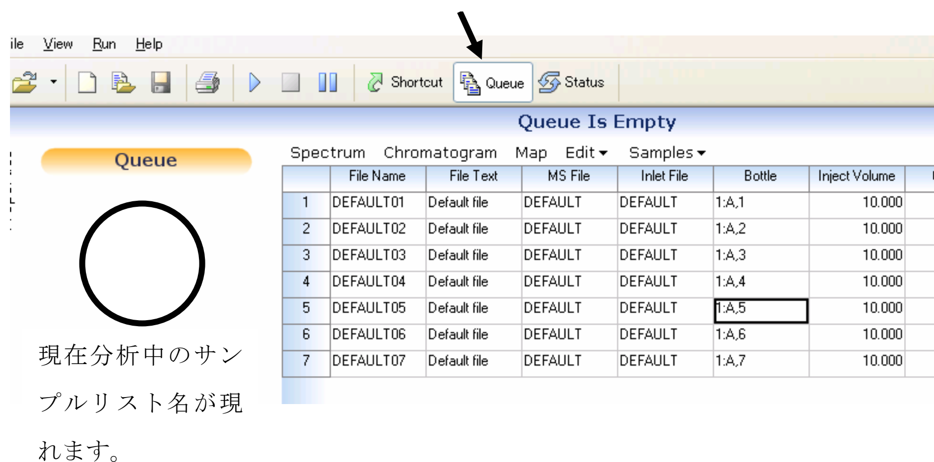



図 40　サンプルキューの確認

[Chromatogram]をクリックすると，リアルタイムのデータがモニターできます（図 41）。

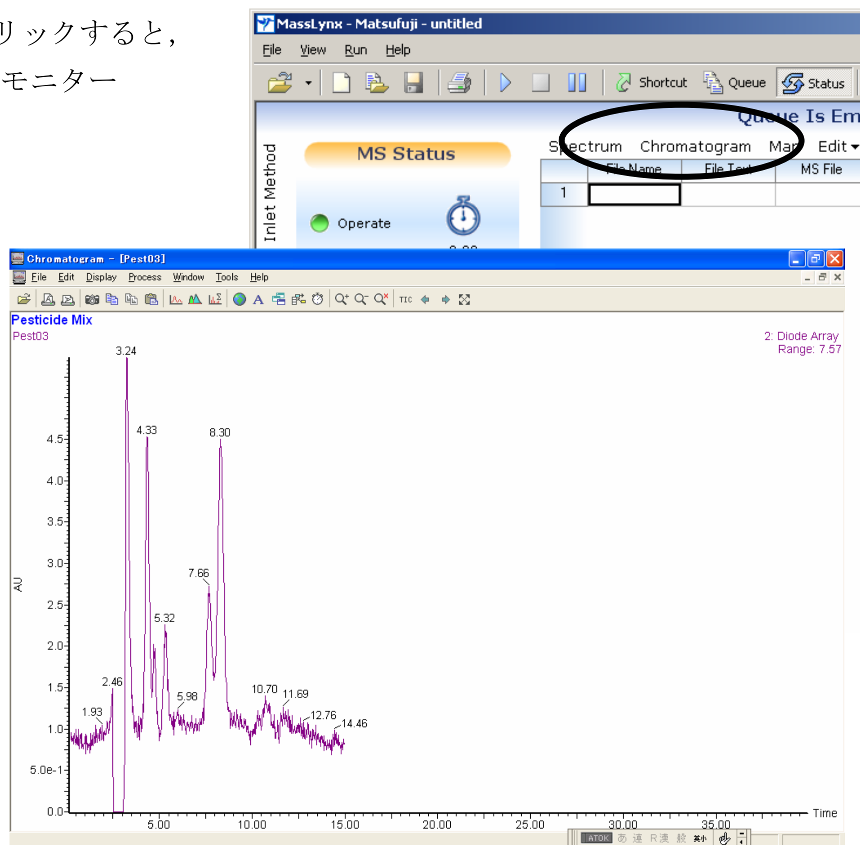



図 41　リアルタイムモニター

[Chromatogram]をクリックした際，UV クロマトグラムが出ず，TIC が出るときがあります。そのときは，[Display]→[TIC…]をクリックし，TIC Chromatogram を出してください（図 42）。

TIC Chromatogram で，[Diode Array]を選択して OK を押すと（図 42），UV クロマトグラムが現れます。

なお，Add trace にマークがついて OK を押すと，2 段になってでてきます。

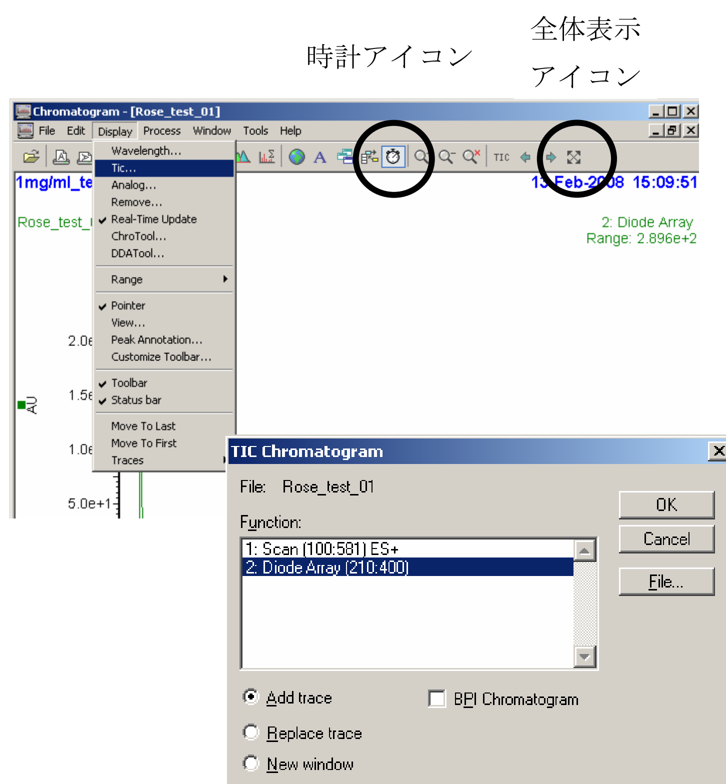



図 42　TIC Chromatogram 画面

時計アイコンでリアルタイムのオンオフ，ドラッグで拡大，全体表示アイコンで元に戻ります。

また UV クロマトグラムのピークの上で，右クリックすると吸収スペクトルが得られます。

詳細は，「解析の手順」を参照してください。

# Ⅲ LC/MS（シングル MS）として利用したい場合

以下の手順で行います。

1.システムの起動
2.Inlet Method の作成
3.MS TUNE の呼び出し
4.MS Method の作成
5.MS へのラインの切り替え
6.サンプルリストの作成
7.分析開始

## 1 操作手順

①システムの起動

②Inlet Method の作成

UPLC のみの利用の項を参考にしてください。

③MS TUNE の呼び出し

※ MS 本体の LOAD ボタンが緑色に点灯しているか，コーン内が移動相で濡れていないかをもう一度確認してください。コーン内が移動相で濡れているときに Operate すると，MS が破損します。

（1）MassLynx の Status ボタン①を押し（図 43），左端にある MS Tune②をクリックする。

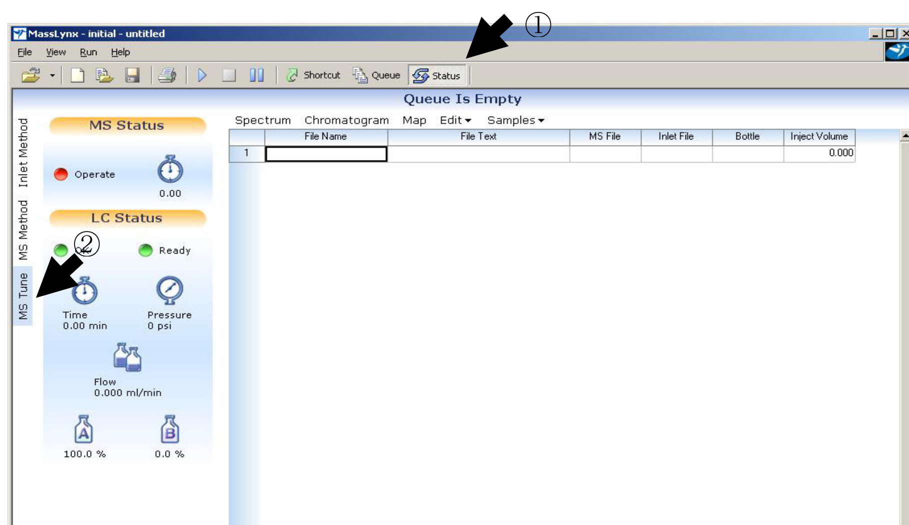



図 43 MS Tune 画面の起動

（２）MS tune 画面が表示されるので，画面上部にある API GAS ボタンをクリックして $N_2$ ガスを供給する（図 44）。続いてその隣にある COL GAS ボタンをクリックし，Collision ガスを供給する（ボタンを押すと，アイコンが白くなり，Gas Flow の赤い玉が浮き上がります）。

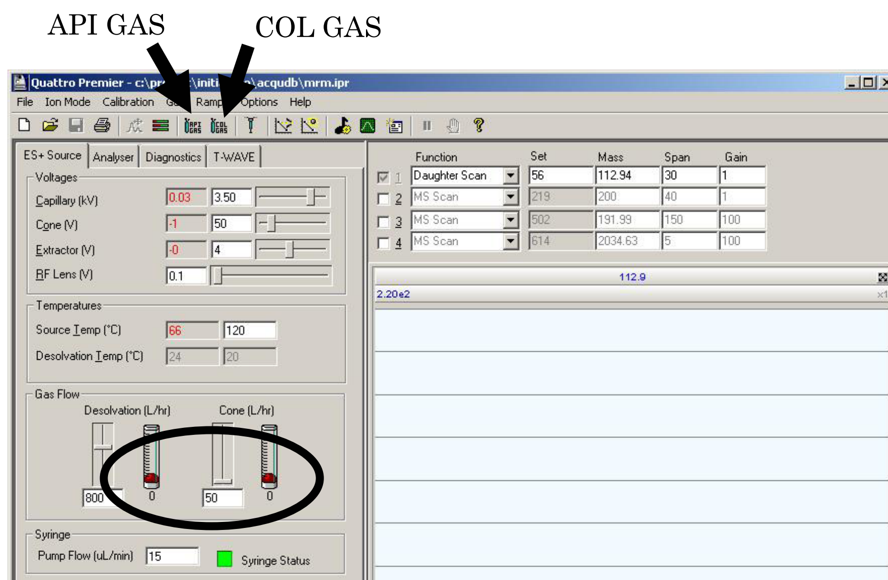



図 44　API ガスとコリジョンガスの供給

（３）[File]-[Open]で MS.ipr ファイルを開く（図 45）。




MSMS による定量を行う場合は　　MRM.ipr
SIR による定量は　　MS.ipr
シングル MS による Scan は　　MS.ipr
Daughter Scan は　　MSMS.ipr
を選択します。

図 45　MS　チューンファイルの読込み

※シングル MS の測定においては，コリジョンガスは不要ですが，COL GAS アイコンは必ず押すようにしてください。コリジョンのアルゴンガスは流れないように，流量 0 mL/min を MS.ipr ファイルで設定しています。

APCI 測定を行う場合

[Options]から[Multiple ion modes] → [ESCi mode]を選択する（図 46）。

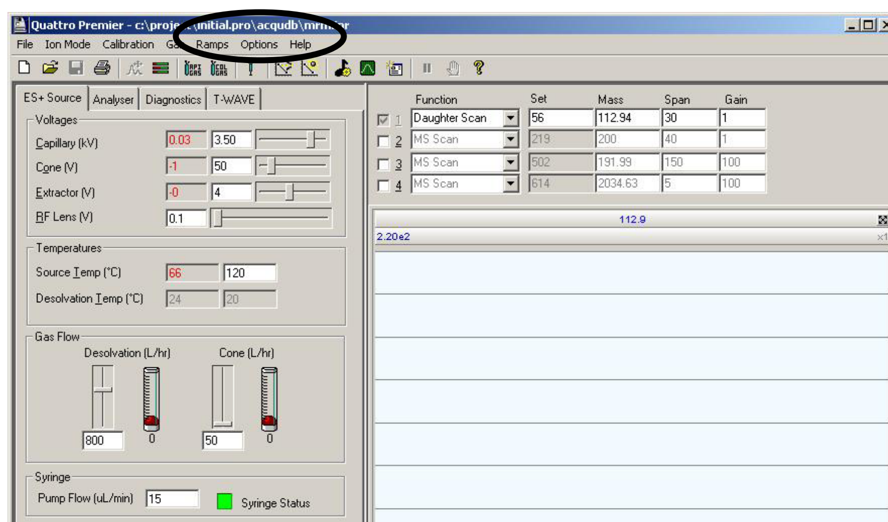



図 46　APCI モードにするとき

データの取り込み条件（MS メソッド）で，ESI と APCI の両モードの設定を行い，一回の測定で両モードの測定を行うことが可能です。

一方，APCI 測定を行わないときは，[Options]から[Multiple ion modes] → [ESCi mode]を押し，APCI モードを設定しないようにしてください。

（4）画面右下にある[Press for operate]をクリックします（図 47）。文字が[Press for Standby]に替わり，隣にあるインジケーターが赤色から緑色に変わったことを確認してください。MS 本体の Operate インジケーターも緑色に点灯します。

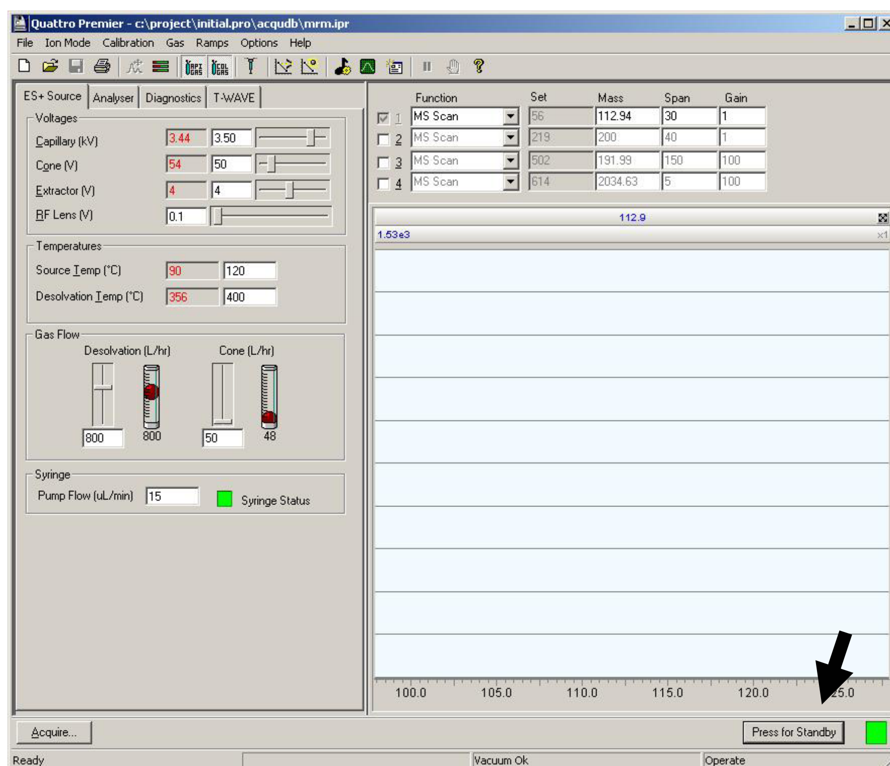


図 47　MS の起動

※下記のことは絶対に行わないでください。

Operate 中は $N_2$ ガスの供給を止めてはいけません。（API GAS）

$N_2$ ガスの供給が停止すると，Source Temperature が高温になり MS がダメージを受けます。

※このファイルを分析中に決して閉じないでください（下に隠しておく）。

④MS Method の作成

シングル MS の場合は，MS Scan および SIR しか使用できません。
MS/MS との同時測定はできません。

（１）Mass Lynx 画面で，MS Method のタグをクリックする（図 48)。

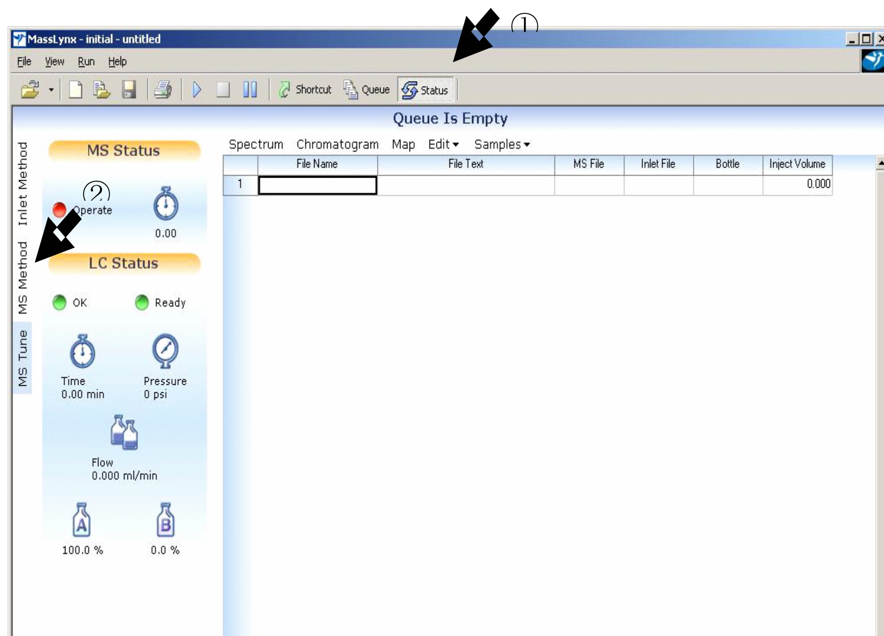



図 48　MS Method 画面の起動

（２）File から New または既存のファイルを呼び出す（図 49)。

（３）Total Run Time に UPLC と同じ分析時間を入力する。

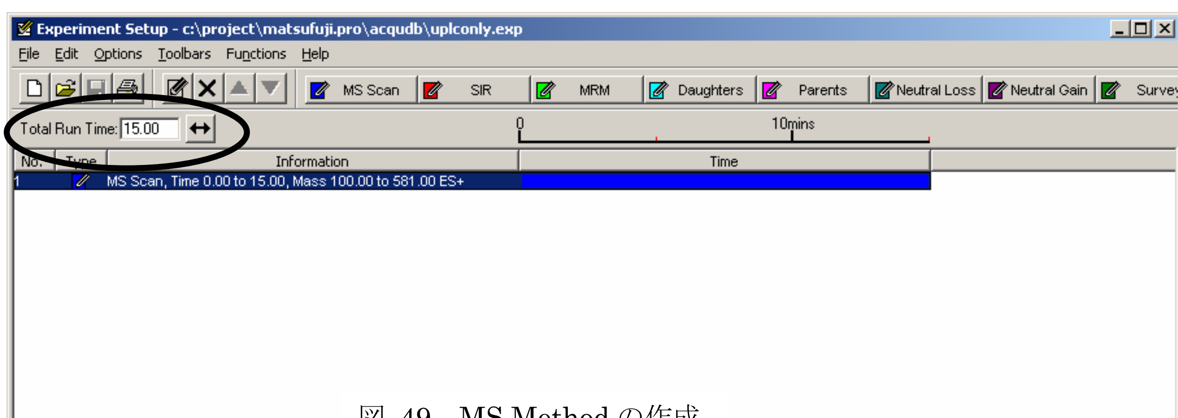



図 49　MS Method の作成

（4）MS 条件の設定（MS Scan または SIR の選択）

MS Scan と SIR は同時に測定することが可能です（図 50）。

[MS Scan]または[SIR]をクリックし，必要事項を入力してください。

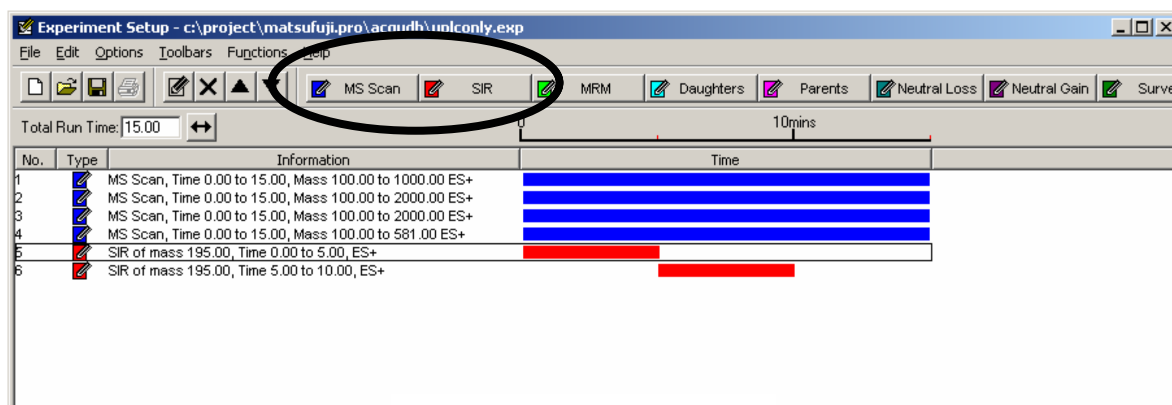



図 50　MS Method の作成

（5）MS Scan をクリックすると，図 51 の MS スキャンの設定ファイルが立ち上がります。

・Mass (m/z)の設定

取り込む質量数の範囲を入力。３０００まで入力可能。

・Time (Mins)の設定

取り込む分析時間の範囲を入力。UPLC の Run Time と同じか短い時間を設定。

・Cone Voltage の設定

コーン電圧を入力。

10～50 V 程度。

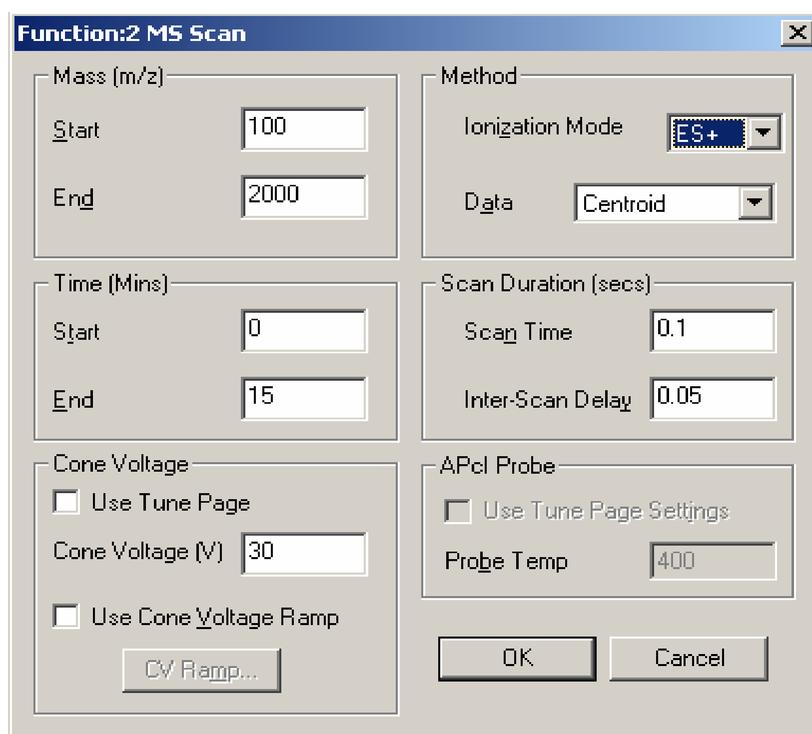



図 51　MS スキャンの設定ファイル

・Method の設定

イオン化モードの選択（ES+，ES-，AP+，AP-を選択）をする。

（APCI 測定を行う場合は，MS チューンで ESCi mode を選択しておいてください）

・Scan Duration (secs)の設定

本装置の 1 秒間のデータ取り込みの最大は 5000 Da です。取り込む質量数の範囲が広いときは，Scan Time を長めに取ってください。2000 Da ぐらいを目指して Scan Time の設定を行ってください。通常 0.5 を設定。

MS スキャンの設定ファイルのおすすめ条件

（１）適当なコーン電圧（20～30V）で，ES+で OK。

（２）[MS Scan]をクリックし，ES+のところを ES-に変更して OK。

（３）（２）同様，AP+，AP-を選択し，OK。

本装置は，ESI のポジ・ネガ，APCI のポジ・ネガが 1 回の分析で測定できます。これで分析を行うことにより，どのイオン化方法で，イオン化されやすいか判別できます。

分析終了後，最適なイオン化を決定し，その後コーン電圧を 10, 20, 30, 40, 50, 60 V とふった条件により再度分析を行うことにより，分子イオン（あるいは擬似分子イオン）ピークが出やすい条件，またはフラグメントイオンが出やすい条件を探すことができます。

SIR の場合

SIR をクリックすると SIR の設定画面（図 52）が出てきます。

定量するイオンピークの質量(Mass)，データの取り込み時間（Dwell：0.2 程度)，イオン化電圧(Cone)を入力し，[Add]を押す。

なお，質量は小数点第 1 位まで入力してください。

Method，Retention Window，（APCI Probe）は必要に応じて変更してください。

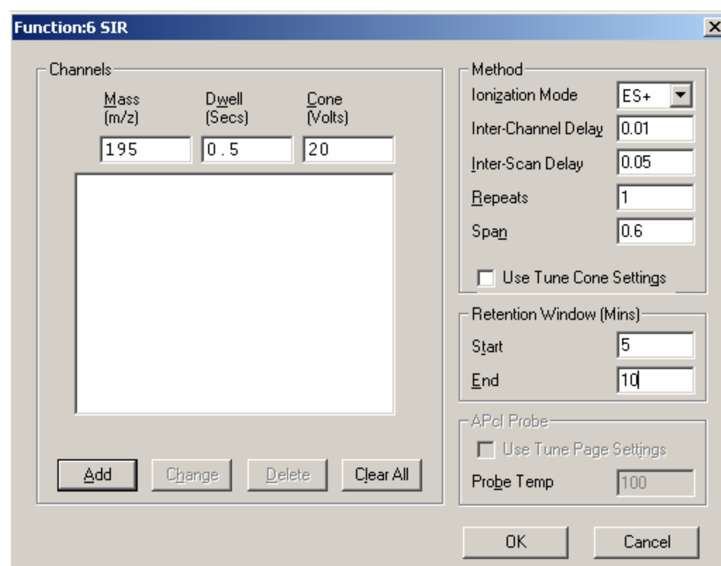



図 52　SIR の設定画面

（６）[File]→[Save As]よりデータを保存する（図 53)。

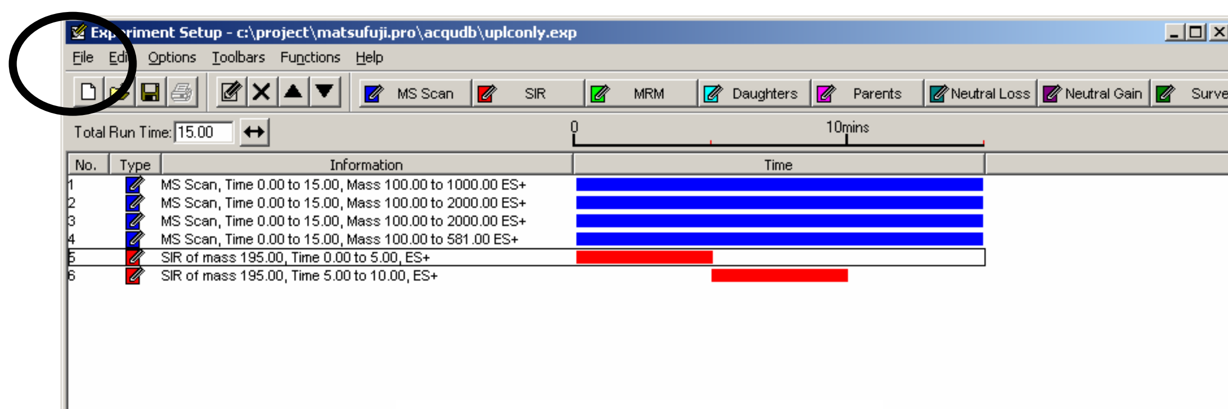



図 53　MS Method ファイルの保存

⑤MS へのラインの切り替え

（１）UPLC の移動相を流す（流速は 0.2～0.4 ml/min としてください）。

（２）MS 本体の INJECT ボタンを押す
（移動相が MS へ流れるように
切り替わります）（図 54）。
INJECT ボタンが緑色に点灯します。
MS チューン画面でイオンピークが
出ていることを確認してください。




図 54　INJECT ボタン

⑥サンプルリストの作成

（１）UPLC のときと同様です。（MS File は上記で作成したものを使用してください。）

（２）UPLC で作成したファイルの MS File（UPLConly）のところを作成した MS ファイルに変更するだけで問題ありません。

（３）サンプルリストを作成した後，[File]→[Save As]よりデータを保存してください（図 55）。

作成した MS ファイル
に変更。

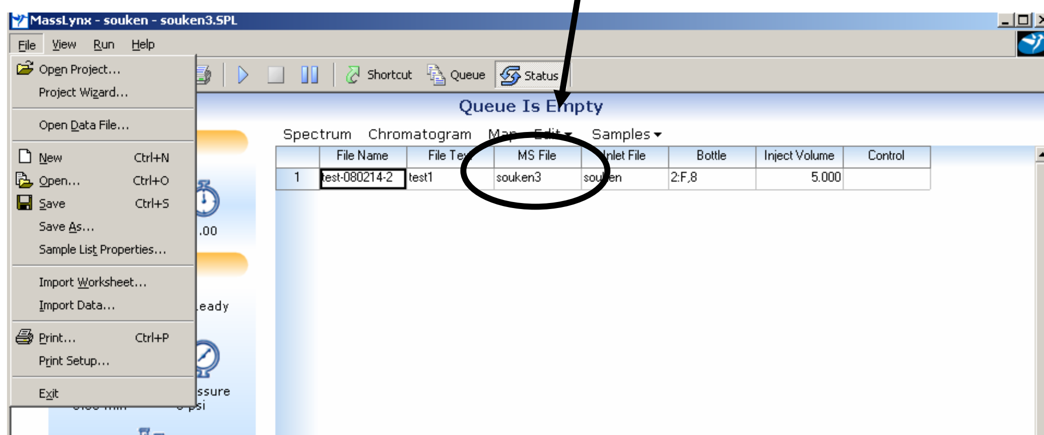



図 55　サンプルリストの作成

⑦分析開始

UPLC のみの利用のところと同様です。

上部にある ▶ マーク（図 57）をクリックすると，分析が開始されます。

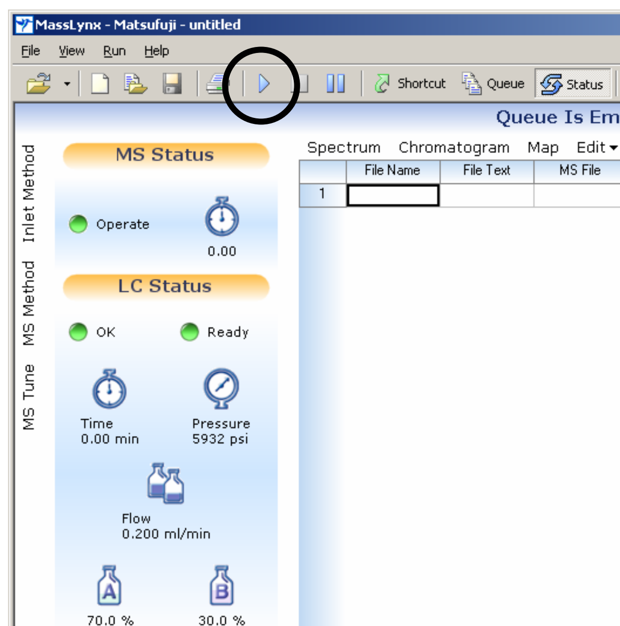



図 57　分析の開始①

複数試料の場合は，分析したいサンプルを選択（行が黒く反転）し，▶ マークをクリックします（図 57）。

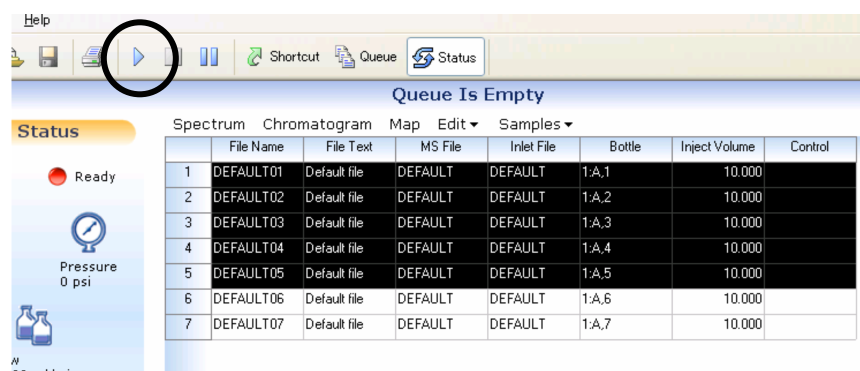



図 57　分析の開始②

UPLC の時と同じ File Name やサンプルリスト名の時は，データが上書きされます（上書きするかどうかのメッセージが現れる）。

もし，UPLC のデータ（UV クロマトグラム）を残したい場合は異なった File Name，サンプルリスト名に変更し，[File]→[Save as]を選んでください。

なお，この測定では，UV クロマトグラムと，シングル MS の TIC（トータルイオンクロマトグラム）が得られるので，実質的には上書きで問題ないと考えます。

①分析中の動作

[Chromatogram]をクリックすると，リアルタイムでモニターできます。
時計アイコンを押すと，リアルタイムでクロマトが出ます。

もし，Diode Array や TIC のどちらか一方しか出ていない場合は，[Display]→[TIC]から必要なデータを読み出してください（図 58)。

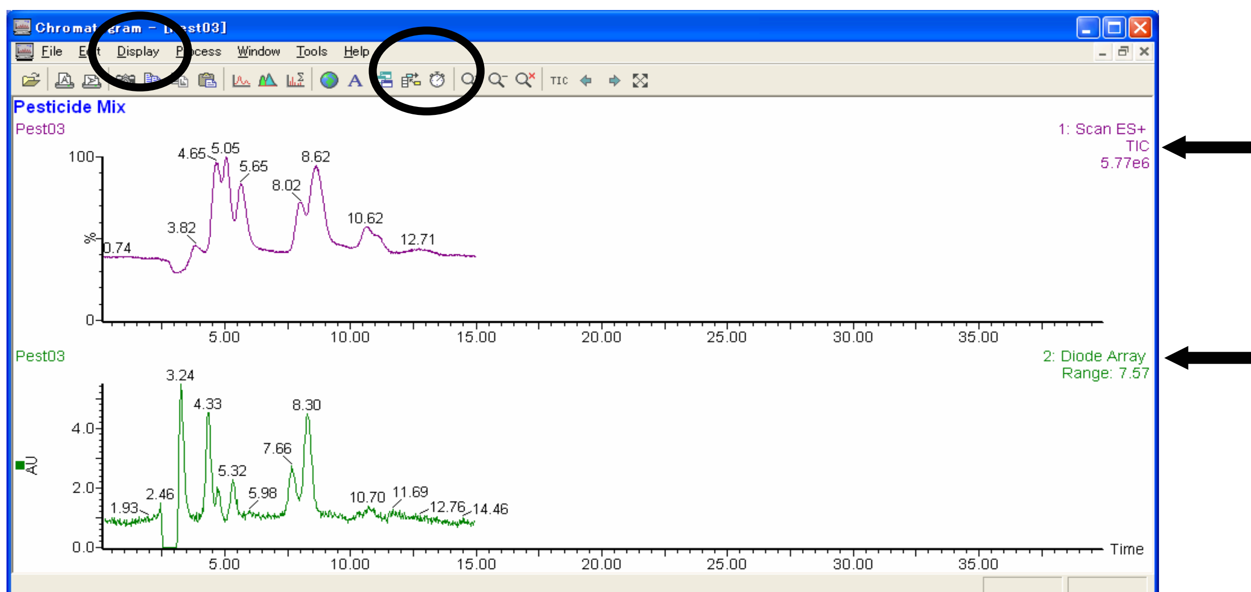



図 58　リアルタイムモニター

Diode Array 上で右クリックすると，吸収スペクトルが得られ、TIC（トータルイオンクロマト）上で右クリックすると，MS スペクトルが得られます（図 59)。

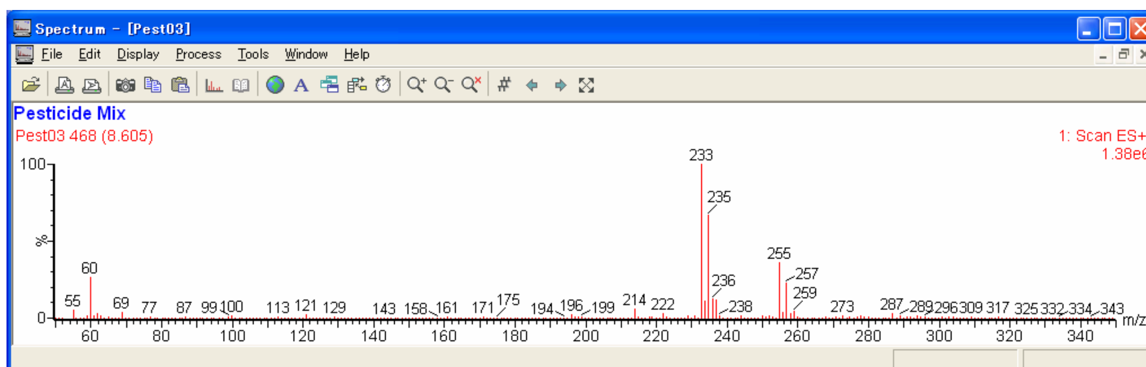



図 59　MS スペクトル

# Ⅳ LC/MS/MS として利用したい場合

**以下の手順で行います。**

1　システムの起動
2　Inlet Method の作成
3　MS TUNE の呼び出し
4　MS Method の作成
5　MS へのラインの切り替え
6　サンプルリストの作成
7　分析開始

おおまかな流れは，LC/MS（シングル MS）としての利用と同様です。異なる点としては，以下の 2 点となります。

## 1　操作手順

①MS TUNE の呼び出し

（図 60）

（MSMS.ipr ファイルを呼び出してください。）

このファイルは分析中決して閉じないでください。

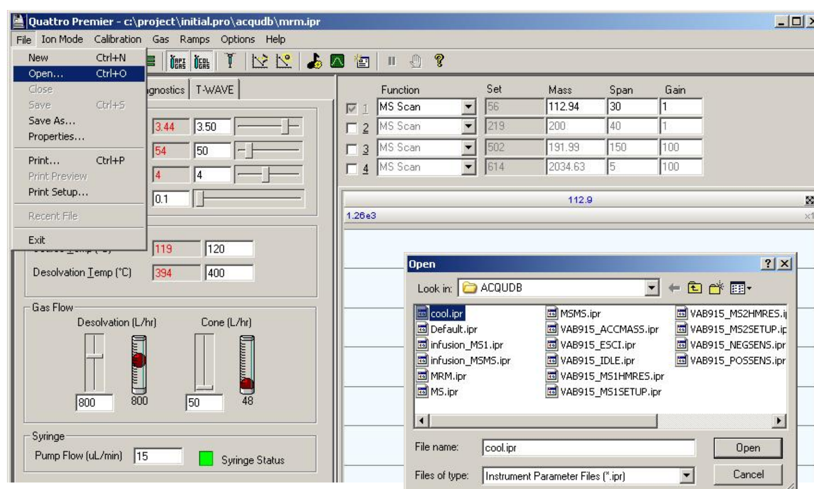


図 60　MS TUNE ファイルの呼び出し

②MS Method の作成

（図 61）　MS Scan と SIR は MS/MS 分析では使用できません。

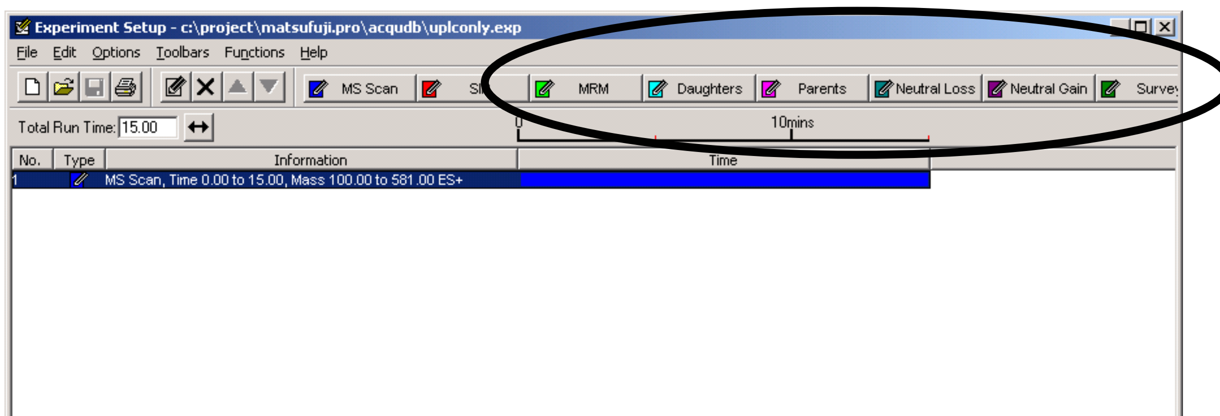



図 61　MSMS 測定時の MS Method の作成

MSMS としてのモードはいくつかありますが，定性分析においてよく利用される Daughter Scan の MS File を示します（図 62）。

（1）Mass (m/z)

シングル MS で得た親イオンを入力します。娘イオンは，基本的には親を超えることはありませんので，それから考え Start と End に質量を入力する。

（2）Time (Mins)

時間を入力する。ただし，カラムから出た成分は UV 検出器から MS に到達するまで約 0.1 分かかりますので，あまり狭い時間に設定しない方がよいでしょう。

また，無駄に長い時間を設定すると，データポイント数が減ってしまいます。

図 62　Daughter Scan 条件の入力

※類似の時間にピークが複数本あったとしても，コンマ何秒で取り込みが切り替わりますので，親イオンの質量がきちんと入力されていれば，MSMS スペクトルに混合物由来のピークは出ません。

（3）Collision Energy

親イオンを壊すのに必要な電圧を入力する。

10, 20, 30, 40, 50, 60V とふると，娘イオンの出やすい条件を見つけることができます。

（4）Method（イオン化方法），Cone Voltage（Cone 電圧）

シングル MS で得られた最適条件を入力する。

（5）データを別名で保存し，分析を開始する。

MRM 分析を目的とした MSMS 測定に関しては，“定量編”を参考にしてください。

# V　基本的な解析手順

## 1　ファイルの呼び出し

[Chromatogram]をクリックする（図 63）。

[File]→[Open]よりデータを開く。

なお，Function のところを見ると，MS Method で測定したデータがありますので，必要なデータを選択してください。

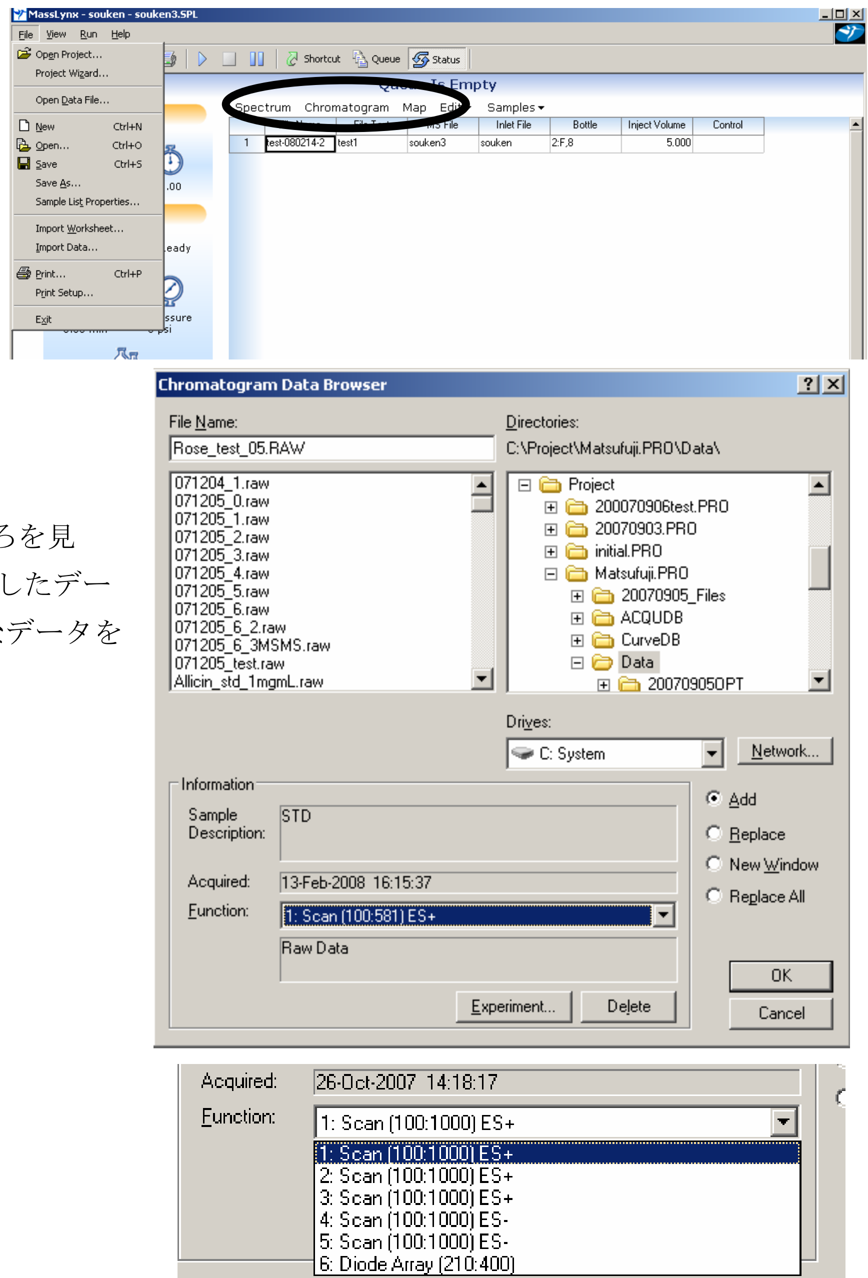



図 63　データの呼び出し

## 2 UV スペクトルを抽出するためには

Diode Array（クロマト）データの上で右クリックすると，UV スペクトルが得られる。（図 64）

複数のピーク上で右クリックを繰り返すと，複数の UV スペクトルが得られる。

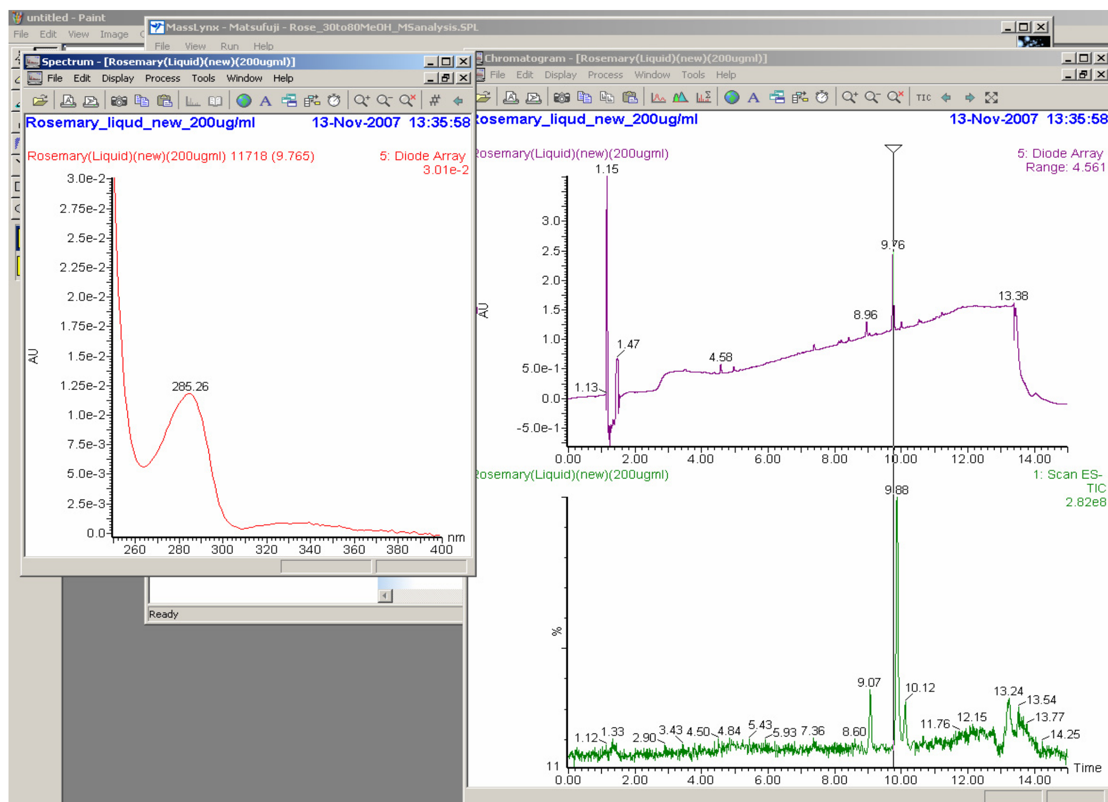
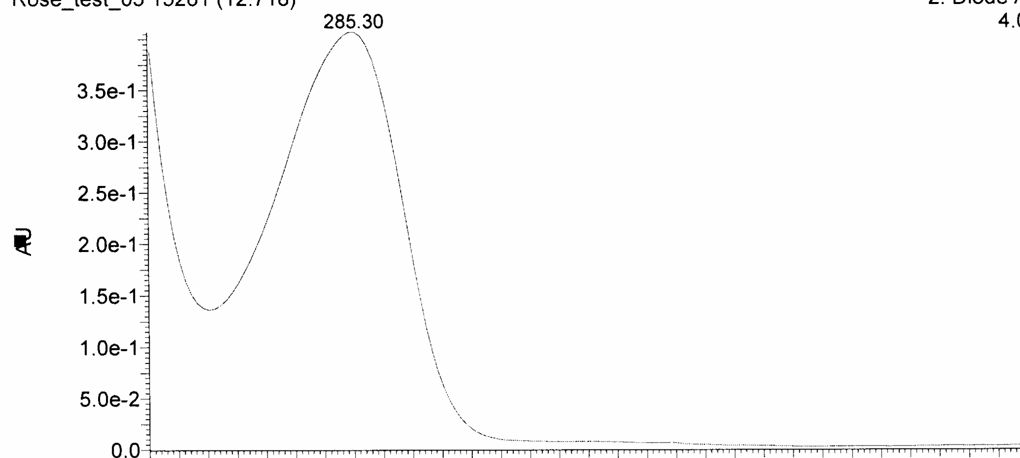
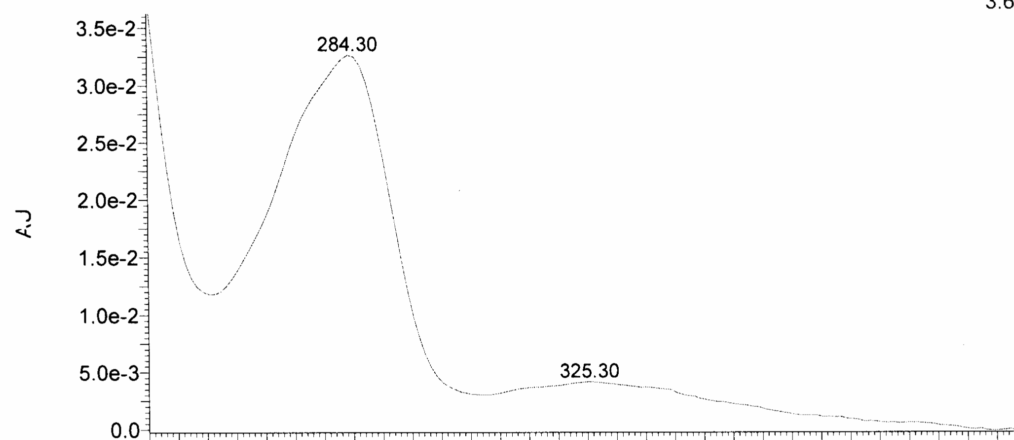
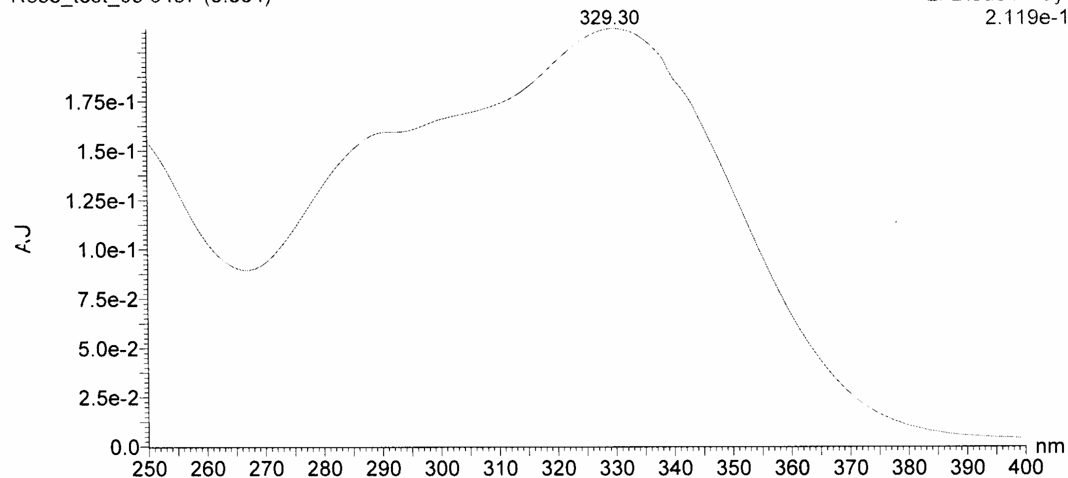



図 64 UV スペクトルの抽出

[File]→[Print]より印刷できます。



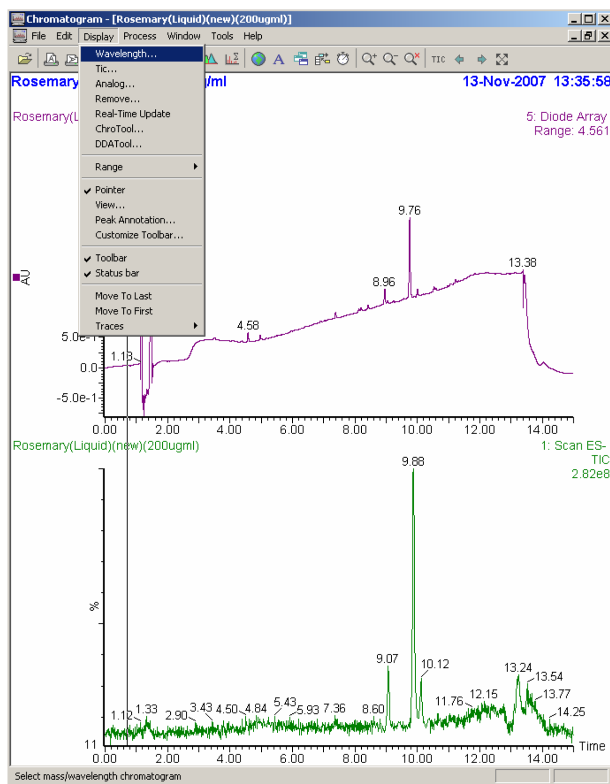



## 3 特定波長のクロマトグラムを作成するためには

①[Display]より[wavelength]を
選択する（図 65)。

②DAD Chromatogram の中の[Description]に波長を入力し，OK をクリックする。



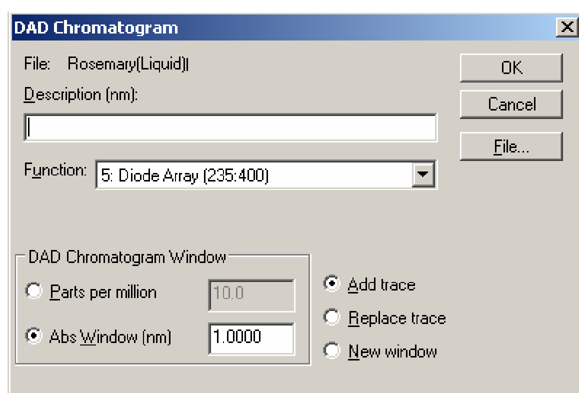
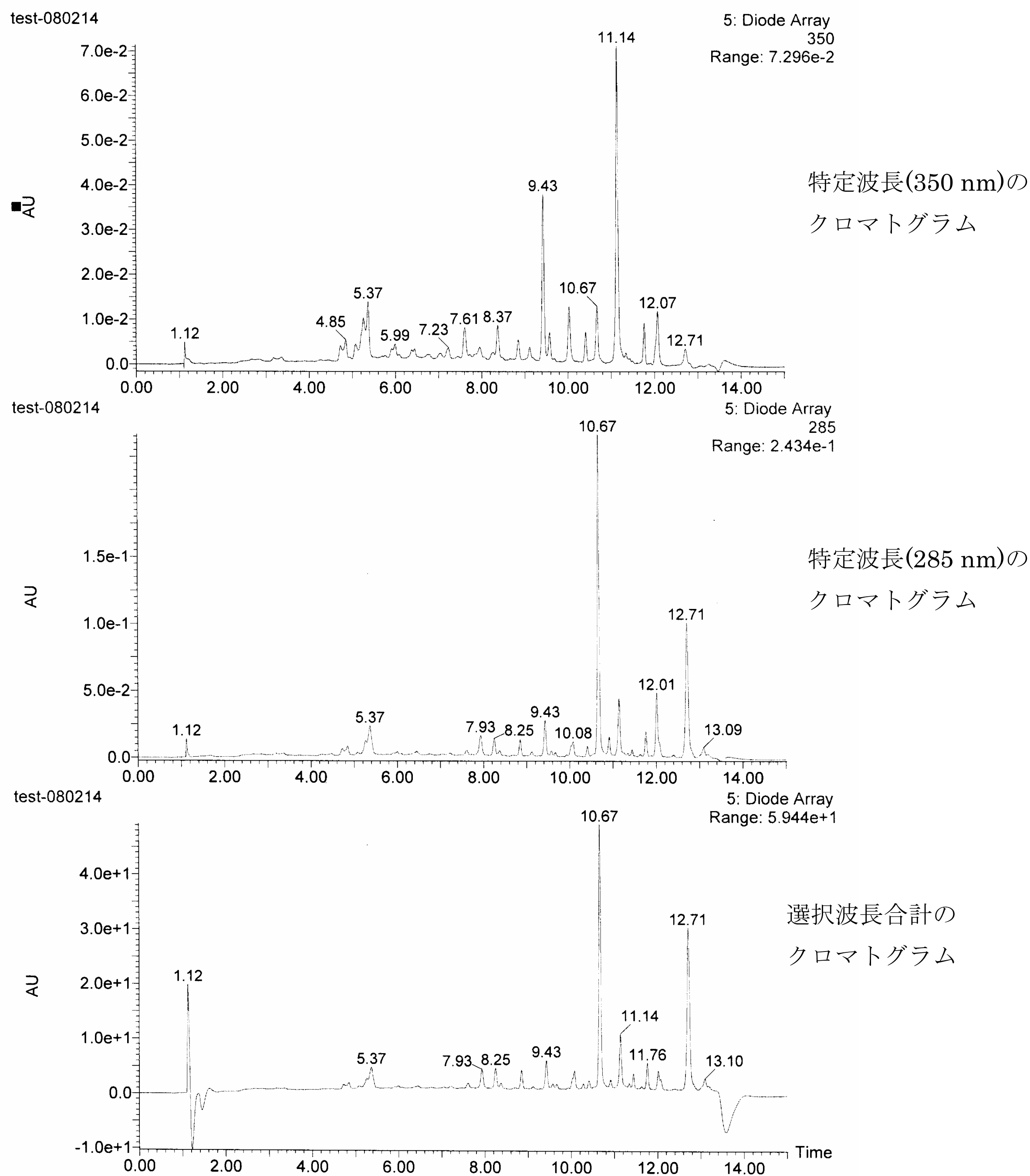




図 65　特定波長の UV クロマトグラムの抽出

[File]→[Print]より印刷できます。

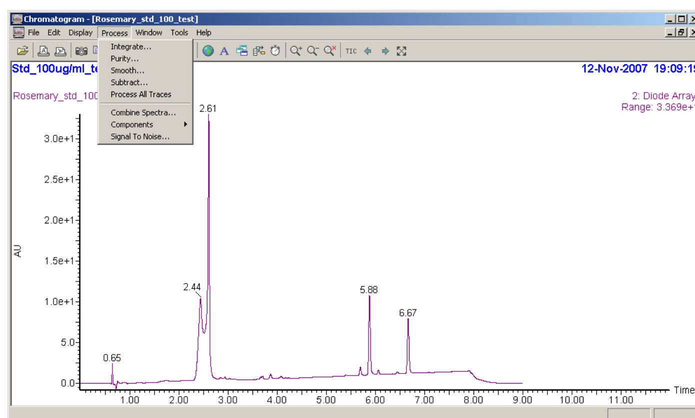


## 4　ピーク面積を得るためには

①[Process]より[Integrate]を選択する（図 66)。

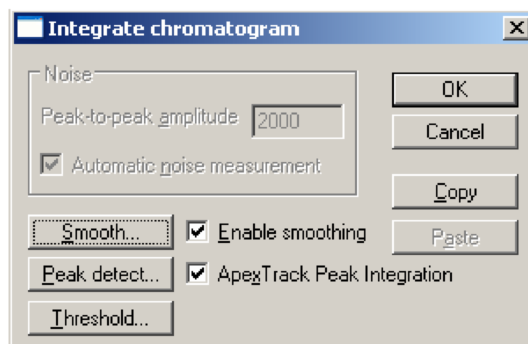
②Integrate chromatogram で OK を
クリックする。

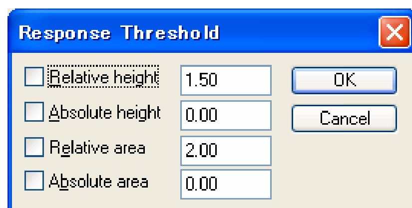
不要なピーク等がある場合は，
[Threshold]にて調節してください。




③[Relative height/area]
最大値に対する相対強度（%）で
しきい値を設定します

④[Absolute height/area]
絶対強度でしきい値を設定します。




ピーク面積が
得られます。

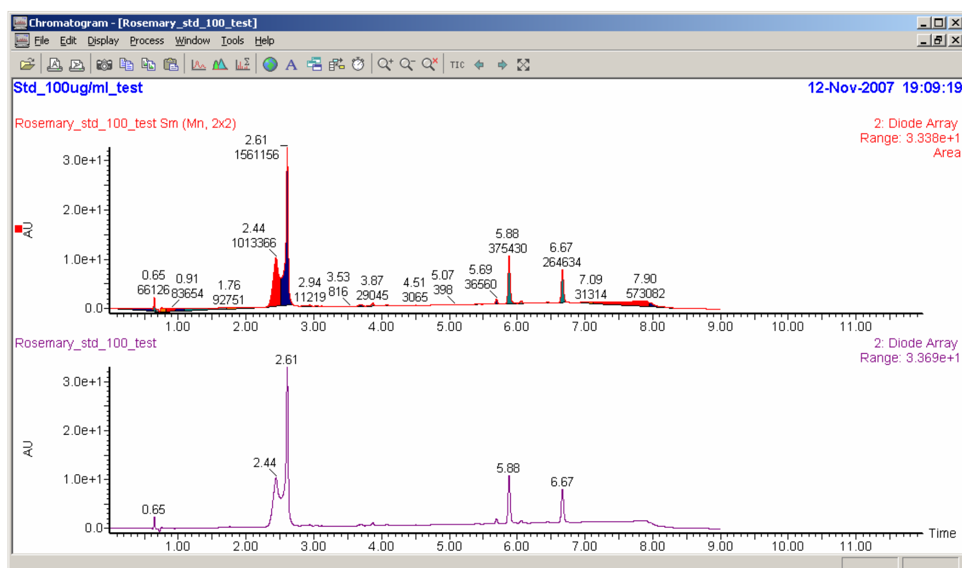



図 66　波形解析

## ５ ＭＳスペクトルを得るためには

TIC のピーク上で右クリックする（図 67）。

または，ピーク上を右ボタンでドラッグすることにより，平均化された MS スペクトルを得ることができます。

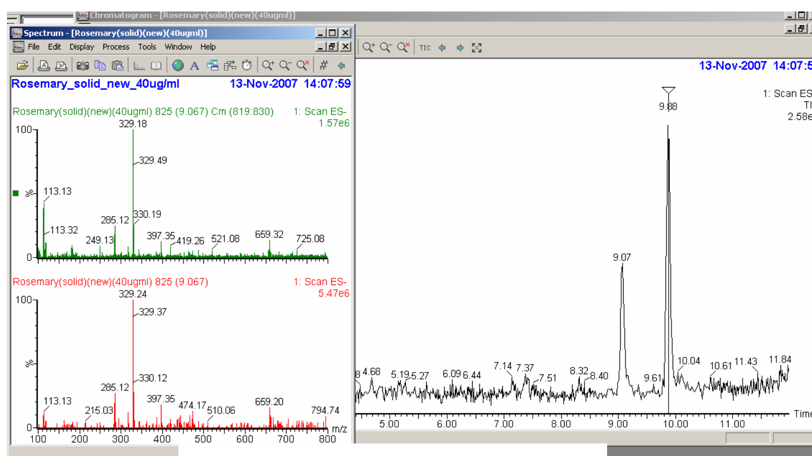



図 67　MS スペクトルの抽出

一方，[Process]→[Combine Spectrum]を選択し，Average に数値入力（あるいは右ドラッグ）することによっても，MS スペクトルを得ることができます（図 68）。

この方法は，さらにベースラインを差し引くことができますので，ノイズの少ない MS スペクトルを得ることができます。

Average には目的ピークを Subtract にはベースラインとなる部分の数値入力あるいは右ドラッグすることにより，ベースラインを差し引いた MS スペクトルを得ることができます。

Subtract には 2 つのデータを入力できるので,目的ピークの前後を右ドラッグするとよいでしょう。

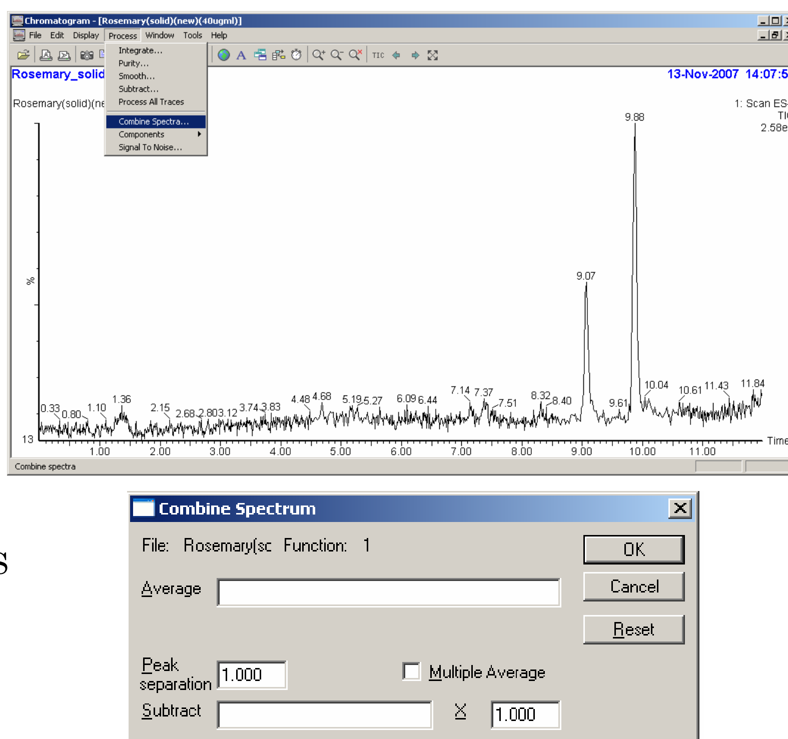



図 68　Combine Spectrum 画面

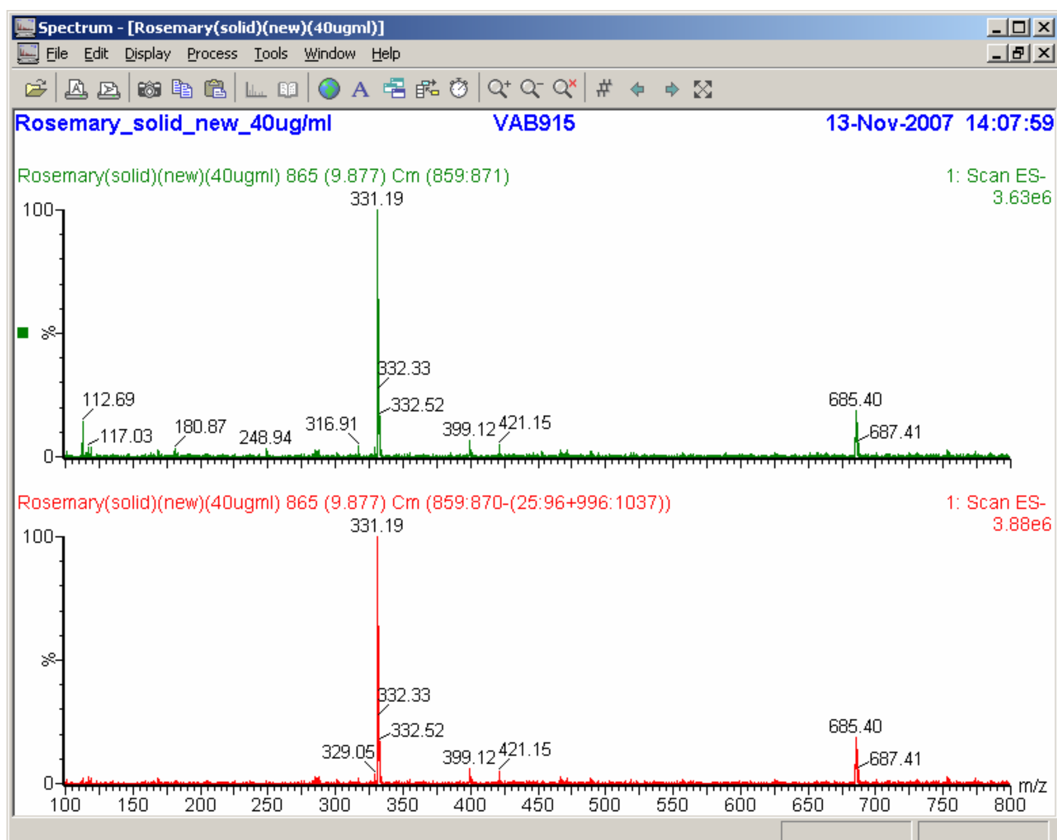
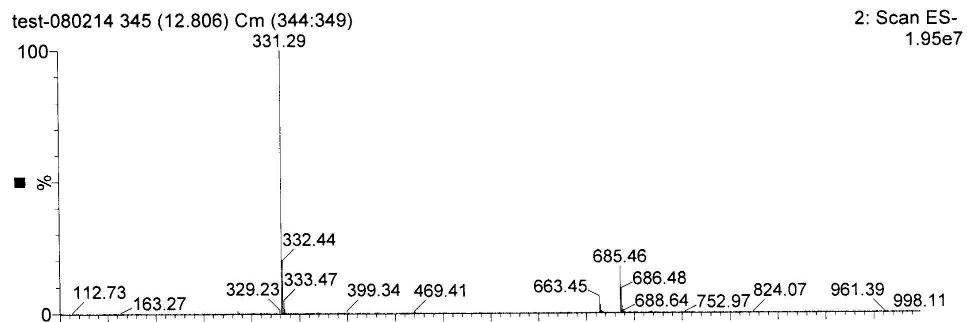
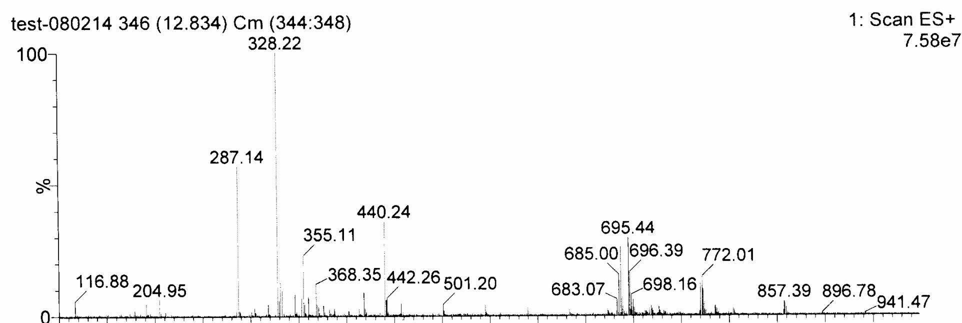
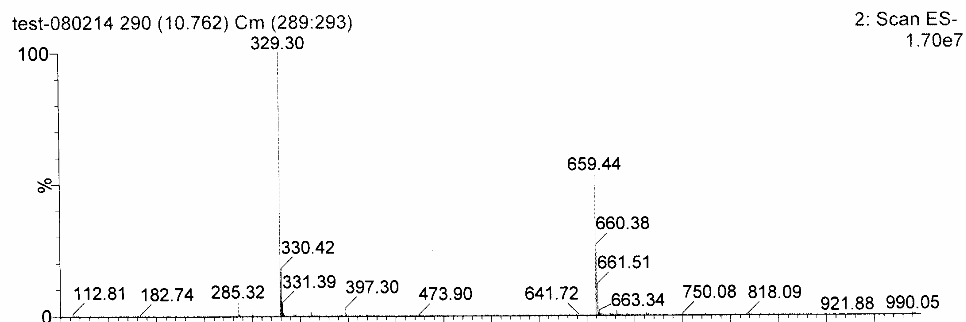


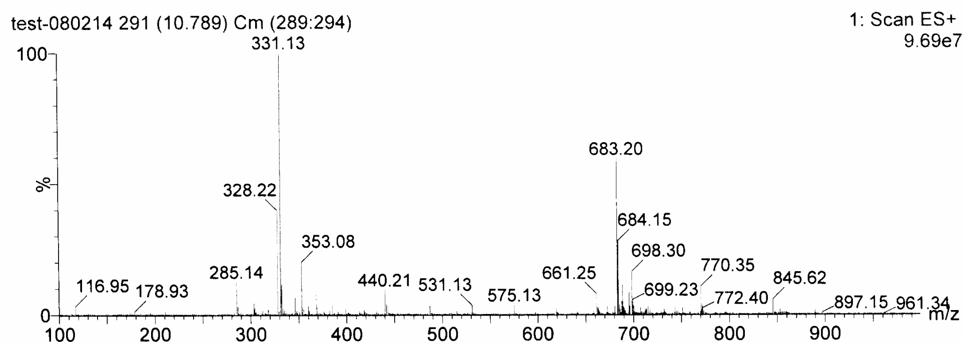

図 69　ベースラインを差し引いたスペクトル

[File]→[Print]より印刷できます。



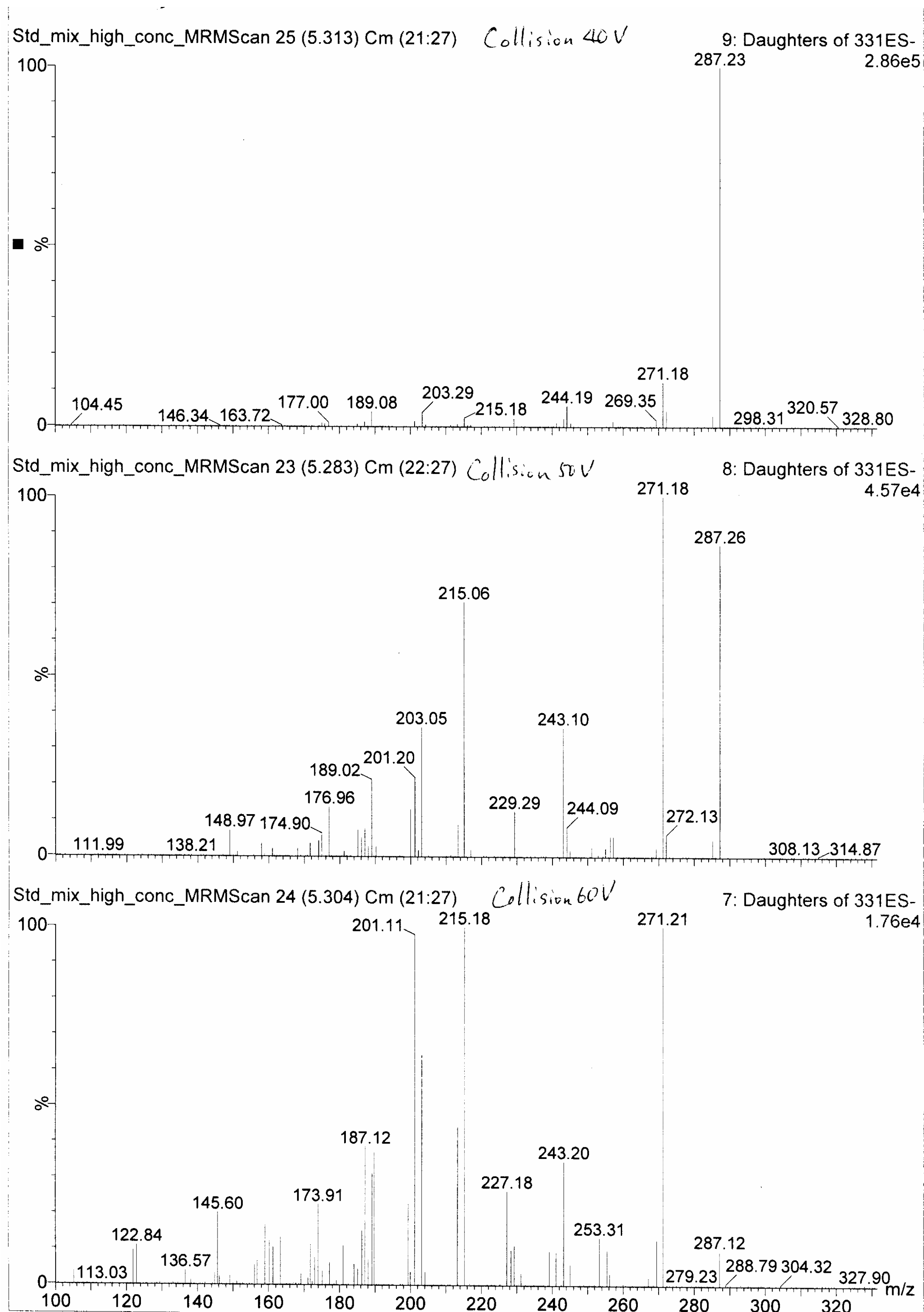



MSMS においても同様です。

Chromatogram 画面より A アイコンをクリックすると文字入力が可能です。

ただし，挿入された文字は一時的なもので，保存はできません。




以上で，定性測定が終了です。

# VI 付録（一般論）

## １ イオン化法

①ESI（エレクトロスプレーイオン化）

液相でのイオン化であり，主に極性化合物・高分子化合物・熱不安定物質に有効である。

ポジティブモードでは$[M+H]^+$，　$[M+NH_4]^+$，$[M+Na]^+$，　$[M+K]^+$など

ネガティブモードでは$[M-H]^-$，$[M+CH_3COO]^-$，　$[M+Cl]^-$など

生体高分子，ポリマーでは多価イオンを生成　$[M+nH]^{n+}$，　$[M+(NH_4)n]^{n+}$，$M-nH]^{n-}$

②APCI（大気圧化学イオン化）

気相でのイオン化であり，ESI と比べて非極性化合物・低分子化合物に有効である。

熱不安定物質の場合，熱分解の可能性あり。

ポジティブモードでは$[M+H]^+$，$M+NH_4]^+$など

ネガティブモードでは$[M-H]^-$，$[M+CH_3COO]^-$

主に一価イオンが生成。

③APPI（大気圧光イオン化）：本装置ではできません。

気相中で放電ランプ下でのイオン化であり，低極性化合物に有効である。

## ２ イオン化法と極性の選択

| | | |
|---|---|---|
| １級～３級アミン | どちらでも | ＋ |
| ４級アミン | ESI | ＋ |
| 塩基性化合物 | どちらでも | ＋ |
| アミノ酸 | どちらでも | ＋ |
| ペプチド | ESI | ＋ |
| ヌクレオチド | ESI | － |
| ヌクレオシド | ESI | ＋ |
| カルボン酸 | どちらでも | － |
| スルホン酸 | ESI | － |
| ニトロ基 | どちらでも | － |
| ステロイド類 | APCI | ＋ |

## ３ 逆相の移動相

イオン化の促進やカラムへの保持，ピーク形状の改善などの目的から，移動相に添加剤を用いることがある。

| 添加剤の例 | 有機溶媒の例 |
|---|---|
| 0.1% ギ酸 | MeOH／MeCN |
| 0.2% 酢酸 | MeOH／MeCN |
| 0.05% TFA | MeCN |
| 10 mM 酢酸アンモニウム | MeOH |
| 無添加 | MeOH／MeCN |

なお，0.5%以上のギ酸・酢酸の使用は，PDA 検出器の立ち上げ時にエラーを引き起こす。
移動相に添加したジオキサン（式量 88）は、付加物を形成する。

## ４ Xbridge カラムと他社カラムの溶出の比較

（問い合わせ中）

作成： 食品科学工学科：松藤　寛